The background of the cover is a photograph of a brown and white cow in a green field. The cow's head is in the foreground, looking slightly to the left. The background shows a blurred landscape with green grass and distant hills under a blue sky.

Hydrolyse und Transport sulfatierter Steroide in den Plazentomen des Rindes: Charakterisierung der Expression und der Funktionen von Steroidsulfatase (StS) und des Natrium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT)

Helga Edith Greven

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Hydrolyse und Transport sulfatierter Steroide in den
Plazentomen des Rindes: Charakterisierung der Expression
und der Funktionen von Steroidsulfatase (StS) und des
Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des PhD-Grades

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Helga Edith Greven

Tierärztin aus Aachen

Giessen 2008

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission:

Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Dr. Hans Michael Piper
(Vorsitzender) und

Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 04. April 2008

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Helga Edith Greven

**Meinen Eltern,
meiner Schwester Anja,
Thomas Kisselbach
und meinen Großeltern gewidmet.**

Die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden
Publikationen veröffentlicht:

Greven, H., M. P. Kowalewski, B. Hoffmann, J. Geyer, M. Rex-Haffner, B. Ugele und G. Schuler (2007). "Bovine placental steroid sulphatase: Molecular cloning and expression pattern in placentomes during gestation and at parturition." Placenta **28**(8-9): 889-97.

Schuler G, **Greven H**, Kowalewski MP, Döring B, Özalp GR, Hoffmann B (2008)
"Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation?" Exp Clin Endocrinology Diabetes (im Druck; Epub ahead of print:
<http://www.thieme-connect.de/ejournals/pdf/eced/doi/10.1055/s-2008-1042408.pdf>)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	5
2 LITERATURÜBERSICHT.....	7
2.1 AUFBAU DER RINDERPLAZENTA.....	7
2.2 ZELLTYPEN DER RINDERPLAZENTA.....	9
2.3 ÖSTROGEN- UND GESTAGENSYNTHESE IN DER RINDERPLAZENTA	12
2.4 PROGESTERON IN DER RINDERPLAZENTA	14
2.5 ÖSTROGENE IN DER RINDERPLAZENTA.....	16
2.6 FUNKTIONEN DER PLAZENTAREN ÖSTROGENE	16
2.7 BILDUNG UND MÖGLICHE BIOLOGISCHE BEDEUTUNGEN SULFATIERTER ÖSTROGENE	18
2.8 STERIODSULFATASEN	20
2.8.1 STERIODSULFATASE DES MENSCHEN	20
2.8.2 STERIODSULFATASE BEI ANDEREN SPEZIES	25
2.9 SODIUM DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTER (SOAT).....	27
3 MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 VERSUCHSTIERE UND PROBENENTNAHME.....	30
3.2 GEWINNUNG VON RNA.....	31
3.3 PCR	32
3.3.1 DNASE-BEHANDLUNG	32
3.3.2 REVERSE TRANSKRIPTION.....	33
3.3.3 QUALITATIVE PCR.....	34
3.3.4 RACE-PCR	35
3.3.5 REAL-TIME RT-PCR.....	40
3.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	45
3.5 EXTRAKTION VON PCR-PRODUKTEN AUS DEM AGAROSEGEL.....	45
3.6 STRATEGIEN ZUR ERMITTLUNG UNBEKANNTER GENSEQUENZEN.....	46
3.6.1 BOVINE STERIODSULFATASE.....	46
3.6.2 BOVINER SOAT UND SEINE VARIANTEN	47
3.7 KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN.....	50
3.8 PROTEINEXPRESSION	51
3.8.1 KLONIERUNG IN DEN EXPRESSIONSVEKTOR	51

3.8.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN	53
3.8.3	UNTERSUCHUNG DER STERIODSULFATASE-TRANSFIZIERTEN ZELLEN AUF STERIODSULFATASEAKTIVITÄT DURCH INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN STERIODSULFATEN	54
3.8.4	TRANSPORTMESSUNGEN AN TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄT DES BOVINEN SOAT	55
3.9	IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER STERIODSULFATASE IN PARAFFINSCHNITTEN VON RINDERPLAZENTOMEN	56
3.10	VERWENDETE LÖSUNGEN, MEDIEN UND PUFFER	58
3.10.1	GELELEKTROPHORESE	58
3.10.2	KLONIERUNG	59
3.10.3	PROTEINEXPRESSION	59
3.10.4	GEWEBEFIXIERUNG UND IMMUNHISTOCHEMIE	61
3.11	VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	62
3.12	VERWENDETE SEREN/ANTIKÖRPER	65
3.13	VERWENDETE GERÄTE	65
3.14	SOFTWARE UND BENUTZTE DATENBANKEN	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	STERIODSULFATASE	68
4.1.1	mRNA-SEQUENZ UND EXON-INTRONSTRUKTUR DES BOVINEN STERIODSULFATASE-GENS	68
4.1.2	EXPRESSION DER STERIODSULFATASE IN DEN RINDERPLAZENTOMEN AUF PROTEINEBENE	70
4.1.3	EXPRESSION DER STERIODSULFATASE IN DEN RINDERPLAZENTOMEN AUF mRNA-EBENE	75
4.1.4	SUBSTRATE DER STERIODSULFATASE	76
4.1.5	STERIODSUFATASE mRNA EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ORGANEN DES RINDES	78
4.2	SOAT	78
4.2.1	NACHWEIS VON FÜNF VARIANTEN AUF mRNA-EBENE IN DER RINDERPLAZENTA	78
4.2.2	SEQUENZANALYSE DER BOVINEN SOAT-VARIANTEN	80
4.2.3	TRÄCHTIGKEITSPROFIL DER SOAT-EXPRESSION IN DER RINDERPLAZENTA AUF mRNA-EBENE	86
4.2.4	SOAT-mRNA EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN RINDERORGANEN	86

4.2.5	TRANSPORT VON STEROIDSULFATEN IN SOAT-TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN	87
5	DISKUSSION	89
5.1	STRUKTUR DES BOVINEN STEROIDSULFATASE-GENS	89
5.2	DISKUSSION DER STEROIDSULFATASE-EXPRESSION IN DER RINDERPLAZENTA	89
5.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE ZUM BOVINEN SOAT	93
5.3.1	ORGANISATION DES SOAT-GENS UND BILDUNG VON SOAT-ISOFORMEN.....	93
5.3.2	DISKUSSION DER SOAT-EXPRESSION IN DEN RINDERPLAZENTOMEN UND WEITEREN GEWEBEN.....	94
5.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	SUMMARY.....	101
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
9	ANHANG	122
9.1	BESTÄTIGUNG DER SPEZIFITÄT DES IN DER IMMUNHISTOLOGIE EINGESETZTEN ANTISERUMS FÜR DIE BOVINE STEROIDSULFATASE MITTELS WESTERN BLOT.....	122
9.2	VERWENDETE SCHMELZTEMPERATUREN DER PRIMER IN DER RT-PCR	123
9.3	VERZEICHNIS VON PUBLIKATIONEN UNTER EINBEZIEHUNG VON ERGEBNISSEN AUS DER EIGENEN ARBEIT	124
9.3.1	ORIGINALARBEITEN UND REVIEWS	124
9.3.2	ABSTRACTS VON VORTRÄGEN UND POSTERN	124
9.3.3	VORTRÄGE UND POSTER AUF NATIONALEN UND INTERNATIONALEN TAGUNGEN, VON DENEN KEINE ABSTRACTS PUBLIZIERT WURDEN	125
10	DANKSAGUNG.....	126
11	LEBENS LAUF	128

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ASBT	apical sodium dependent bile salt transporter
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
BSA	bovines Serumalbumin
bStS	bovine Steroidsulfatase
DHEA	Dehydroepiandrosteron
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
FKS	fötales Kälberserum
GABA-Rezeptor	γ -Aminobuttersäure-Rezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HEK-Zellen	humane, embryonale Nierenzellen
hStS	humane Steroidsulfatase
NTCP	Natriumtaurocholat-Cotransport Polypeptid
ORF	open reading frame (Leserahmen)
P450 _{scc}	Cytochrom P450 side chain cleaving Enzym
PAG	trächtigkeitsassoziiertes Glykoprotein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PRP	Prolactin Related Protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SULT	Sulfotransferase
SULTE1	Östrogensulfotransferase
StAR	Steroid Acute Regulatory Protein
StS	Steroidsulfatase
Soat	sodium dependent organic anion transporter
TGC	Trophoblast Giant Cells (Trophoblastriesenzellen)
UTC	einkernige (uninukleäre) Trophoblastzellen
UTR	untranslated region (nicht in Aminosäuren übersetzter Genbereich)

1 Einleitung

Die Plazenta des Rindes produziert außerordentlich hohe Östrogenmengen. Primärer Synthesort der trächtigkeitsassoziierten Östrogene beim Rind ist der Trophoblast (Schuler et al. 1994, 2006a). Mit Ausnahme der letzten zwei Wochen der Trächtigkeit dominiert im maternalen Blut Estronsulfat deutlich über die freien Östrogene Estron, Östradiol-17 α und β (Hoffmann et al. 1997). Estronsulfat ist deutlich polarer als Estron und kann daher im Gegensatz zu den wesentlich lipophileren freien Östrogenen die Zellmembran erheblich schlechter via Diffusion überwinden. Es bindet nicht an die klassischen nukleären Östrogenrezeptoren α und β (Hähnel et al. 1973, Kuiper et al. 1997). Die Sulfatierung wird daher als ein wichtiger, zur Inaktivierung und Ausscheidung biologisch aktiver Östrogene führender Schritt angesehen (Falany 1997).

Ein deutlicher Anstieg der freien Östrogene wird erst in den beiden letzten Wochen der Gravität beobachtet (Hoffmann et al. 1997). Dieser wird im Allgemeinen im Zusammenhang mit der Vorbereitung des weichen Geburtsweges auf die bevorstehende Geburt und der Euteranbildung gesehen. Die Bedeutung der bereits unmittelbar nach der Plazentation einsetzenden Produktion trächtigkeitsassoziiierter Östrogene (Eley et al. 1979; Hoffmann et al. 1997) vor dem präpartalen Zeitraum ist derzeit weitgehend unklar. Möglicherweise stellen beim Rind die plazentaren Östrogene keine Hormone im eigentlichen Sinn, sondern lokale Regelfaktoren mit Bedeutung vor allem für die Stimulation des Karunkelwachstums dar (Hoffmann und Schuler 2002; Schuler et al. 2002; 2005).

In den Plazentomen des Rindes entsteht Estronsulfat durch die Sulfatierung von Estron. Die Sulfatierung geschieht offensichtlich bereits unmittelbar im Anschluss an die Östrogensynthese in den Trophoblastriesenzellen (Hoffmann et al. 1976; Hoffmann 1983, Mattioli et al. 1984; Brown et al. 1987; Hoffmann et al. 2001, Schuler et al. 2006, Ushizawa et al. 2007). Es stellt sich somit die Frage, wozu in der Rinderplazenta fast während der gesamten Trächtigkeit große Mengen an Östrogenen gebildet werden, wenn der bei weitem überwiegende Anteil das maternale Kompartiment bereits in inaktivierter Form erreicht. Die Bedeutung dieses Phänomens ist bis heute unklar.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde jedoch besonders im Zusammenhang mit der Entstehung menschlicher Mammakarzinome erkannt, dass die im Vergleich zu freien Östrogenen in deutlich höheren Konzentrationen zirkulierenden, sulfatierten Östrogene einen Pool inaktiver Prekursoren darstellen können, aus dem biologisch aktive Östrogene durch die Einwirkung

einer Steroidsulfatase (StS) freigesetzt werden können ("Sulfatase Pathway") (Santner et al. 1984, Santen et al. 1986, Pasqualini et al. 1992). Daher wurde in der eigenen Arbeitsgruppe die Hypothese entwickelt, dass die Sulfatierung trächtigkeitsassoziierter Östrogene der Limitierung ihres Effekts auf ein spezifisches Spektrum trächtigkeitsrelevanter Zielzellen dient. Nach dieser Hypothese könnten nur die östrogenresponsiven Zellen durch Estronsulfat angesprochen werden, die neben Östrogenrezeptoren auch eine Steroidsulfatase exprimieren. Gleichzeitig wäre dabei der Gesamtorganismus vor unerwünschten systemischen Effekten hoher Östrogenspiegel geschützt. Hinweise darauf, dass in den Rinderplazentomen Estronsulfat Substrat eines trächtigkeitsspezifischen Sulfatase Pathways sein könnte, sind durch Arbeiten der eigenen und anderer Arbeitsgruppen vorhanden. Die Östrogenrezeptoren α und β wurden im maternalen Anteil von Plazentomen nachgewiesen (Boos et al. 2000; Schuler et al. 2002, 2005), somit stellen die während der Gravidität stark wachsenden Karunkeln potentielle Zielorgane plazentarer Östrogene dar. In den Rinderplazentomen konnte weiterhin in Untersuchungen an Homogenaten die Aktivität einer Steroidsulfatase gezeigt werden, wobei sich in den Karunkeln deutlich höhere Aktivitäten fanden als in den Kotyledonen (Hoffmann et al. 2001a). Ziel dieser Arbeit war es daher, genauere Informationen hinsichtlich der Existenz eines trächtigkeitsspezifischen Sulfatase-Pathways in den Rinderplazentomen zu erarbeiten. Neben der Steroidsulfatase konzentrierten sich diese Untersuchungen auch auf den kürzlich bei Ratte und Mensch beschriebenen Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT, SLC10A6), welcher in Studien an transfizierten Zellen effektiv die zelluläre Aufnahme von Estronsulfat vermittelte (Geyer et al. 2004, 2007).

Im einzelnen sollte folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

- 1) Charakterisierung von Steroidsulfatase und Soat des Rindes auf molekularer Ebene
- 2) Charakterisierung der Substratspezifität von Steroidsulfatase und Soat des Rindes
- 3) Charakterisierung der Expression von Steroidsulfatase und Soat in den Rinderplazentomen auf Protein- bzw. mRNA-Ebene in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau der Rinderplazenta

Die Rinderplazenta wird als *Placenta mutiplex* oder *cotyledonaria* bezeichnet (Strahl 1912). Dies bedeutet, dass eine enge Verzahnung zwischen fetalen und maternalen Plazentaanteilen nicht über die gesamte Oberfläche des Trophoblasten stattfindet, sondern auf multiple diskrete Bereiche begrenzt ist, welche als Plazentome bezeichnet werden (Leiser 1975). Der mütterliche Teil der Plazentome entsteht aus den Karunkelanlagen des Endometriums. Die Karunkelanlagen sind bereits beim fetalen Uterus vorhanden (Atkinson et al. 1984). Anzahl und Anordnung variieren jedoch stark zwischen den einzelnen Wiederkäuerspezies (Mossman 1987). Beim Rind sind sie in 4 Reihen mit je 10-15 Anlagen entlang jedes Uterushornes angeordnet und beim adulten, nicht-graviden Rind ca. linsengroß. Mit Eintritt der Plazentation verändern sich diese Karunkelanlagen. An den Stellen, wo sich Chorion und die maternalen Karunkelanlagen berühren, entstehen auf fetaler Seite sog. "milky patches". In diesen Bereichen senken sich Chorionzotten mit den der Allantois entstammenden Gefäßen in präformierte Krypten der Karunkelanlagen ein und verzweigen sich im weiteren Verlauf der Gravidität zunehmend, während sich die Karunkelanlage mehr und mehr aufwölbt und an Größe zunimmt (Bjorkman 1954; Hradecky 1988; Rüsse 1993). Mit der Größenzunahme der Karunkel kommt es basal zu einer Einschnürung, wodurch der 2-3 cm lange Karunkelstiel entsteht. Das Plazentom bekommt so eine pilzartige Form (Abb. 1).

Um den 100. Trächtigkeitstag hat das Plazentom nahezu seine endgültige Form angenommen. Es besteht nun aus einer fetalen Kappe (Chorionplatte), von der aus sich Primärzotten in die Tiefe der Karunkel eingesenkt haben, die sich immer weiter verästelten und dadurch Sekundär- und Tertiärzotten gebildet haben. Analog dazu entwickelt sich auf maternaler Seite das Kryptensystem der Karunkel (Bjorkman 1954).

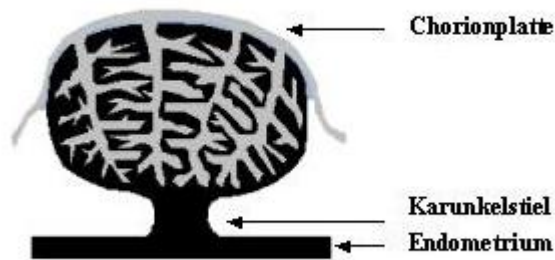


Abb. 1: schematische Darstellung eines Rinderplazentoms. Der maternale Anteil ist schwarz, der fetale Anteil grau dargestellt.

Über die Größenzunahme der Plazentome gibt es widersprüchliche Angaben. Nach Laven und Peters (2001) wächst das Plazentom bis ca. zum Tag 200 der Trächtigkeit, während Schnorr 1996 von einer Größenzunahme bis zum Ende der Trächtigkeit berichtet. Die Plazentome können dabei bis zu faustgroß werden. Bei der Größe der Plazentome spielt vor allem deren Lage in Bezug zur Insertion des Nabels an der Plazenta eine Rolle. So findet man die größten Plazentome meistens in der Nähe der Eintrittsstelle der Nabelgefäße in die Plazenta (Schnorr 1996).

Die Plazentome verankern die Fruchthülle im mütterlichen Uterus. Die starke Verästelung sowohl des maternalen und als auch des fetalen Anteils im Plazentom bewirkt gleichzeitig eine erhebliche Oberflächenvergrößerung der feto-maternalen Kontaktfläche und damit mehr Fläche für den Stoffaustausch (Bjorkman 1954; Hradecky 1988; Rüsse 1993; Leiser et al. 1997a; Leiser et al. 1997b). Gemäß dem Vorhandensein der Gewebeschichten im Bereich des feto-maternalen Kontakts wird die Plazenta des Rindes als Placenta epitheliochorialis klassifiziert (Wathes und Wooding 1980). Stoffe, die vom Fetus ins mütterliche Kompartiment gelangen oder umgekehrt verkehren, müssen daher folgende Schichten durchqueren: fetales Endothel, fetales Stroma, Trophoblast, maternales Epithel, maternales Stroma, maternales Endothel. Bei vielen anderen Tierarten wie z.B. Hund, Maus, Ratte und auch dem Menschen kommt es dagegen bei der Entwicklung der Plazenta durch Invasion von Trophoblastzellen in das maternale Kompartiment je nach Spezies zu einem mehr oder weniger weitreichenden Abbau von maternalen Schichten (Grosser 1927, Amoroso 1959, Carter und Enders 2004). In der Rinderplazenta zeigen nur die Trophoblastriesenzellen eine Invasivität, die jedoch sehr schwach ausgeprägt ist (siehe Kap. 2.2).

2.2 Zelltypen der Rinderplazenta

Die Rinderplazentome bestehen im wesentlichen aus folgenden Zelltypen: fetale Endothelzellen, fetale Stromazellen, Trophoblast mit einkernigen Trophoblastzellen und Trophoblastriesenzellen sowie deren intermediären Differenzierungsstadien, Karunkelepithelzellen, Karunkelstromazellen und maternale Endothelzellen.

Das einschichtige Karunkelepithel bildet den Abschluss des maternalen Kompartimentes und steht im direkten Kontakt zum Trophoblasten. Die Zellen des Karunkelepithels sind in der Regel einkernig, vereinzelt treten aber auch mehrkernige Karunkelepithelzellen auf (Björkman 1954, 1968, 1969). Sie besitzen in der frühen und mittleren Gravidität überwiegend eine kubische Form. In der Endphase der Gravidität ist eine zunehmende Abflachung zu beobachten. Dieser Prozess scheint von der Karunkeloberfläche auszugehen und sich in Richtung Karunkelstiel fortzusetzen. Vor allem in chorionplattennahen Bereichen kann das Karunkelepithel unter der Geburt sogar völlig verschwinden. Die prä- und intrapartale Reduktion des Karunkelepithels wird mit der Reifung der Plazenta und der Vorbereitung auf die Plazentaablösung in Verbindung gebracht, da bei Tieren mit verzögertem Nachgeburtsabgang diese Veränderungen deutlich weniger ausgeprägt zu finden sind (Woicke et al. 1986). Karunkelepithelzellen exprimieren die Östrogenrezeptoren α und β sowie den Glucocorticoidrezeptor (Boos et al. 2000; Schuler et al. 2002, 2005), jedoch nicht den Progesteronrezeptor (Schuler et al. 1999). Das Karunkelepithel zeichnet sich durch eine hohe Proliferations- aber auch Apoptoserate aus (Hoffmann und Schuler 2002; Boos et al. 2003). Abgestorbene Karunkelepithelzellen werden vor allem vom Trophoblasten phagozytiert. Der hohe Zellumsatz im Karunkelepithel hat zu der Theorie geführt, dass das Karunkelepithel eine Ernährungsfunktion für das fetale Kompartiment ähnlich einer holokrinen Drüse hat (Schuler 2000, Hoffmann und Schuler 2002).

Das Karunkelstroma erscheint im histologischen Schnitt deutlich kompakter als das Stroma der Chorionzotten. Die Zellen sind langgestreckt und enthalten einen spindelförmigen Kern. Karunkelstromazellen sind mesenchymalen Ursprungs und exprimieren die Östrogenrezeptoren α und β , den Progesteronrezeptor und den Glucocorticoidrezeptor (Schuler et al. 1999, 2002, 2005; Boos et al. 2000).

Die maternalen und fetalen Endothelzellen bilden die Kapillaren und die Auskleidung größerer Blutgefäße. Es wurde berichtet, dass sie über Östrogenrezeptoren verfügen und den Glucocorticoidrezeptor exprimieren (Boos et al. 2000; Schuler et al. 2002, 2005).

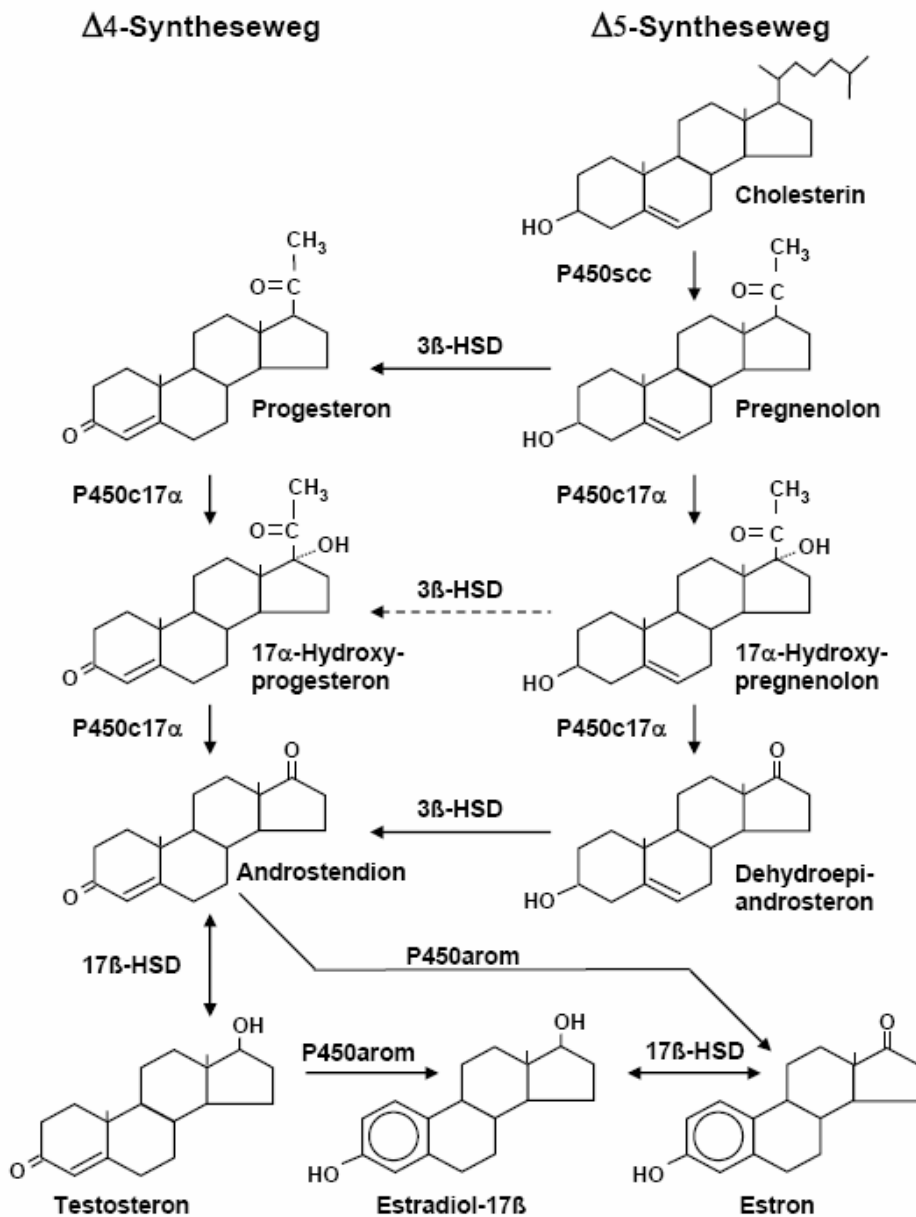
Einkernige Trophoblastzellen haben eine meist kubische bis langgestreckte Form, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Trophoblastriesenzellen jedoch stark verändert sein kann (Björkman 1954; Leiser 1975). Sie sind ektodermalen Ursprungs und exprimieren schwach den Östrogenrezeptor β (Schuler et al. 2005). Die einkernigen Trophoblastzellen verfügen über einige steroidogene Enzyme wie die 17α -Hydroxylase (Schuler et al. 2006) und das Side Chain-cleaving Enzyme (Ben-David and Shemesh 1990) (siehe auch Kap 2.3).

Trophoblastriesenzellen (Trophoblast Giant Cells, TGC; synonym: Binucleate Cells, BNC) sind die größten Zellen im Rinderplazentom. Sie haben meistens zwei Kerne, vereinzelt sind aber auch Trophoblastriesenzellen mit nur einem Kern oder mehr als 2 Kernen anzutreffen. Bei immaturren Trophoblastriesenzellen sind die Kerne eher rundlich, wogegen sie bei ausdifferenzierten Stadien ovaler erscheinen. Nach Klisch et al. (1999) entstehen sie aus einkernigen Trophoblastzellen durch eine Abfolge von zwei azytokinetischen Mitosen, gefolgt von einer S-Phase ohne anschließender Mitose. Die reifen Trophoblastriesenzellen des Rindes besitzen demnach in der Regel zwei Kerne mit einem DNA-Gehalt von 8C. Es wurden vereinzelt aber auch Kerne mit einem höheren DNA-Gehalt beobachtet. Die Trophoblastriesenzellen des Rindes sind endokrin aktiv. Sie produzieren Östrogene (Schuler et al. 2006a) und Progesteron (Reimers et al. 1985). Diese Zellen sind voll beladen mit glykoproteinhaltigen Granula (Klisch et al. 2005; Wooding et al. 2005), die das morphologische Äquivalent einer ausgeprägten Synthese von Proteohormonen darstellen, darunter das plazentare Laktogen (Wooding 1982; Duello et al. 1986; Morgan et al. 1989; Wooding et al. 1992). Weitere Syntheseprodukte der Trophoblastriesenzellen des Rindes sind Pregnancy-associated Glycoproteins (PAGs) und die Prolactin-related Proteins (PRPs), deren Funktionen bisher unklar sind (Duello et al. 1986, Zoli et al. 1992; Klisch und Leiser 2003; Wooding et al. 2005, Klisch et al. 2006).

Nach ihrer Bildung wandern die ausdifferenzierten Trophoblastriesenzellen auf das maternale Epithel zu, dringen in es ein und/oder fusionieren mit einer Karunkel-epithelzelle. Die so entstandenen Hybridzellen gehen jedoch sehr rasch zu Grunde und schilfern von der maternalen Basalmembran ab. Ihre Überreste werden im Trophoblasten phagozytiert (Wooding und Wathes 1980; Wooding 1982; Klisch et al. 1999). Damit sind die Trophoblastriesenzellen die einzigen Zellen in der Rinderplazenta mit einer – wenn auch sehr limitierten - invasiven Aktivität. Über die Funktion der Hybridzellen wird spekuliert. Eventuell wird durch die Fusion und anschließende Apoptose der Übertritt hochmolekularer Stoffe ins maternale Kompartiment erleichtert (Wooding 1982; Green und Roberts 2006).

Aber auch an der „Plazentareifung“ scheinen die Trophoblastriesenzellen beteiligt zu sein. So nimmt ihr Anteil an den Trophoblastzellen unmittelbar präpartal und unter der Geburt deutlich von ca. 20% auf ca. 5% ab. Bei Plazenten mit verzögerter Ablösung ist dies nur eingeschränkt zu beobachten (Woicke et al. 1986).

2.3 Östrogen- und Gestagensynthese in der Rinderplazenta



P450scc = Cytochrom P450 side-chain-cleavage
P450c17α = Cytochrom P450c17α (17α-Hydroxylase-C17,20-Lyase)
3β-HSD = 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase-Δ5/4-Isomerase
17β-HSD = 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
P450arom = Aromatase

Abb. 2: Allgemeine Darstellung der Synthese von Gestagenen, Androgenen und Östrogenen. Im Gegensatz zu einigen anderen Spezies findet beim Rind eine Umwandlung von 17α-Hydroxyprogesteron in Androstendion praktisch nicht statt (Schuler et al. 1994; Conley und Bird 1997).

Die Steroidhormone werden chemisch in drei Gruppen unterteilt (Abb. 2): die C₂₁-Steroide (Gestagene, Glucocorticoide, Mineralocorticoide), die C₁₉-Steroide (Androgene) und die C₁₈-Steroide (Östrogene). Sie sind nicht nur an der Reproduktion beteiligt, sondern steuern auch viele andere Körperfunktionen. Zu den klassischen, steroidproduzierenden, endokrinen Organen zählen die Gonaden, die Nebennierenrinde und bei vielen Säugetieren auch die Plazenta. Aber auch in den Zellen anderer Organe wie zum Beispiel Haut und Gehirn sind Enzyme des Steroidstoffwechsels zu finden (Berkovitz et al. 1984; Roselli und Resko 2001).

Hauptort der Progesteronsynthese in den Rinderplazentomen sind die Kotyledonen, wo deutlich höhere Progesterongewebekonzentrationen im Vergleich zur Karunkel gemessen wurden. Auch die 3 β -HSD-Aktivität war in den Kotyledonen deutlich höher als in den Karunkeln (Tsumagari et al. 1994). Versuche mit fetalen Plazentazellen, getrennt in uninukleäre Trophoblastzellen (UTC) und Trophoblastriesenzellen (TGC) zeigten eine deutlich stärkere Progesteronsynthese in der Trophoblastriesenzell-Fraktion als in der uninukleären Trophoblastzell-Fraktion (Reimers et al. 1985).

Durch Inkubationsversuchen mit Kotyledonengewebe bzw. daraus gewonnenen Homogenaten wurde der Δ 5-Syntheseweg als Hauptweg der plazentaren Östrogenproduktion beim Rind identifiziert (Evans und Wagner 1981; Gross und Williams 1988, Schuler et al. 1994). Bei der Inkubation von Kotyledonenhomogenaten mit Progesteron stoppte die Synthese bei 17 α -Hydroxyprogesteron, ohne dass nennenswerte Mengen an Androstendion oder Östrogenen gebildet wurden. Beim Rind scheint somit 17 α Hydroxyprogesteron den Endpunkt des Δ 4-Syntheseweges darzustellen (Schuler et al. 1994; Conley und Bird 1997). Bei graviden Rindern wurde bei Inkubationen von Kotyledonenhomogenaten mit Pregnenolon hauptsächlich Progesteron gebildet. Unter der Geburt wurde dagegen aus Pregnenolon überwiegend Estron synthetisiert. Eine nennenswerte Metabolisierung von 17 α -Hydroxyprogesteron war auch unter der Geburt nicht zu beobachten. Diese Experimente zeigten somit, dass der präpartale Östrogenanstieg beim Rind nicht auf eine verstärkte Metabolisierung von Progesteron in Östrogene zurückzuführen ist, sondern dass der unmittelbar präpartal stattfindende Zusammenbruch der plazentaren Progesteronsynthese aus der gesteigerten Einschleusung des Präkursors Pregnenolon in den Δ 5-Syntheseweg resultiert. Hauptursache für diese präpartale Umstellung des plazentaren Steroidstoffwechsels ist eine deutliche Aufregulierung der plazentaren 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase in den einkernigen Trophoblastzellen (Schuler et al. 1994, 2006a).

Die steroidogenen Enzyme sind in der Rinderplazenta auf zellulärer Ebene kompartmentalisiert. Das **Side-chain Cleavage Enzyme (P450scc)** wurde von Ben-David und Shemesh

(1990) immunelektronenmikroskopisch in den einkernigen Trophoblastzellen, nicht jedoch in den Trophoblastriesenzellen nachgewiesen. Weiterhin wurde die Expression dieses Enzyms in den Karunkel epithelzellen detektiert. Die **17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase (P450c17)** ist in den Kotyledonen und dort in den einkernigen Trophoblastzellen, nicht aber in den Trophoblastriesenzellen vorhanden. Zwischen dem 90. Trächtigkeitstag und der Geburt weist sie ein dreiphasiges Expressionsmuster auf. Zwischen dem 90. und ca. 150. Trächtigkeitstag wird sie in allen Bereichen des Chorionzottenbaumes exprimiert. Danach beschränkt sich ihre Expression weitgehend auf den basalen Bereich der Chorionstammzotten. Erst in den letzten drei Graviditätswochen breitet sich dann ihre Expression wieder in alle Bereiche des Chorionzottenbaumes aus (Schuler et al. 2006a). Die **3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 5/4-Isomerase (3 β -HSD)** wurde mittels in Situ-Hybridisierung vorwiegend in den reifenden Trophoblastriesenzellen nachgewiesen. Die vollständig ausgereiften Stadien wiesen dagegen keine Signale auf (Özalp 2005). Bezüglich der **Aromatase (P450arom)** konnte immunhistologisch gezeigt werden, dass sie während der Trophoblastriesenzelldifferenzierung aufreguliert wird und am stärksten in den ausgereiften Trophoblastriesenzellen exprimiert wird (Schuler et al. 2006a). Die Aktivität der **Östrogensulfotransferase (SULT1E1)** wurde bei Inkubationsversuchen mit Gewebekomogenaten sowohl im fetalen als auch im maternalen Teil der Plazentome nachgewiesen, wobei die gemessene Substratumwandlung in den Kotyledonen deutlich höher war als in den Karunkeln (Mattioli et al 1984; Möstl 1986; Falter 1999, Hoffmann et al 2001). Offensichtlich beruht der schwächere Nachweis der Östrogensulfotransferaseaktivität in den Karunkeln auf einer Kontamination der maternalen Gewebepreparation mit fetalen Anteilen, denn immunhistologisch und mittels In situ-Hybridisierung war die Östrogensulfotransferase ausschließlich in den Trophoblastriesenzellen nachweisbar (Brown et al. 1987; Ushizawa et al. 2007).

2.4 Progesteron in der Rinderplazenta

Progesteron gilt als das schwangerschaftserhaltende Hormon bei Säugetieren. Durch Bindung an myometriale Progesteronrezeptoren induziert es den sogenannten Wehenblock und damit die Ruhigstellung der Uterusmuskulatur (Csapo und Pinto-Dantas1965; Korenman und Krall 1977; Mesiano 2004).

Während der Trächtigkeit findet man beim Rind zwischen ca. 6 und 12 ng/ml Progesteron im peripheren Blut. In den ersten drei Monaten der Gravidität stellten (Hoffman et al. 1977) und Schallenberger et al. (1985) durchschnittlich 11,6 ng/ml im Blut von Kühen fest. Im vierten

und fünften Trächtigkeitsmonat verzeichneten sie dann einen leichten Abfall auf ca. 9 ng/ml, der sich bis kurz vor der Geburt fortsetzt. 72-24 Stunden vor der Geburt kommt es dann zu einem drastischen Progesteronabfall auf Werte unter 1 ng/ml (Henricks et al. 1971; Hoffmann et al. 1977; Schallenberger et al. 1985; Eissa and el-Belely 1990; Birgel und Grunert 1996; Arakane et al. 1997).

Die Hauptprogesteronquelle während der gesamten Trächtigkeit des Rindes ist das Ovar. Wird das Corpus luteum graviditatis zerstört oder entfernt, kommt es zum systemischen Progesteronabfall und zum Abort. Lediglich im Zeitraum zwischen dem ca. 180. und 250. Trächtigkeitstag kann plazentares Progesteron alleine die Trächtigkeit aufrecht erhalten, wie durch Ovariectomie bzw. Luteolyse-Induktion gezeigt werden konnte (Estergreen et al. 1967; Day 1977; Johnson et al. 1981; Wendorf et al. 1983; Pimentel et al. 1986).

Im Plazentagewebe wurden Progesteronwerte von Tsumagari et al. (1994) im siebten Monat von 2,9 µg/g Protein und im achten Monat von 2,86 µg/g Protein gemessen. Schuler (2000) fand in den Kotyledonen Konzentrationen von ca. 15 ng/g Gewebe im 8. Monate bzw. ca. 22 ng/g am Tag 270 der Trächtigkeit. Im maternalen Anteil der Plazentome blieben die Progesteronkonzentrationen zwischen dem 150. und 270. Tag relativ konstant bei 3,5 ng/g Gewebe und lagen damit deutlich niedriger als in den Kotyledonen.

Über eine eigenständige Funktion des plazentaren Progesterons wird noch diskutiert. Da die plazentare Progesteronsynthese, mit Ausnahme des begrenzten Zeitraumes zwischen dem 180. und 250. Tag, nicht ausreicht um die Trächtigkeit ohne Progesteron lutealen Ursprungs aufrechtzuerhalten, wird eine lokale, parakrine Funktion vermutet (Schuler et al. 1999). Dafür spricht, dass der Progesteronrezeptor im Karunkelstroma und in den Kapillarpericyten der Plazentome, also in unmittelbarer Nachbarschaft des progesteronproduzierenden Trophoblasten exprimiert wird (Schuler et al. 1999; Boos et al. 2000). Hohe lokale Progesteronkonzentrationen könnten eine wichtige Rolle für die Modulation des Immunsystems im graviden Uterus spielen. Einen Hinweis darauf ergaben Untersuchungen an Schafen, bei denen hohe Dosen an Progesteron die Sekretion des "Uterine Milk Proteins" stimulieren, welches Lymphozyten hemmt (Hansen 1998; Hansen and Tekin 2005; Hansen 2007). Aber auch ein modulierender Effekt auf das menschliche Immunsystem ist bekannt (Piccinni et al. 1995; Piccinni 2005). So könnten hohe lokale Progesteronkonzentrationen im graviden Uterus eine Immunreaktion der Mutter gegen den Fetus unterdrücken, ohne die systemische Abwehr erheblich zu schwächen.

Aber auch ein lokaler Effekt des plazentaren Progesterons auf das Wachstum und die Differenzierung der Plazentome ist denkbar. Man kennt mehrere Zelltypen, bei denen Progesteron

an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Dazu gehören Epidermiszellen (Tammi 1982), Osteoblasten (Tremollieres et al. 1992) und Granulosazellen (Chaffkin et al. 1993). Auch am Uterus sind solche Wirkungen bekannt. So bewirkt Progesteron in Kombination mit Wachstumsfaktoren eine vermehrte Proliferation und Differenzierung der endometrialen Stromazellen bei Mensch und Ratte (Irwin et al. 1991; Piva et al. 1996). Es kann jedoch auch die östrogenabhängige Proliferation des Endometriumepithels hemmen (Schindler 1997; Moyer und Felix 1998).

2.5 Östrogene in der Rinderplazenta

Östrogene sind in hohen Konzentrationen ca. ab dem 100. Trächtigkeitstag im peripheren Blut gravider Rinder zu finden (Hoffmann et al. 1997). Dabei dominiert bis kurz vor der Geburt das Estronsulfat. Der Estronsulfatverlauf im peripheren mütterlichen Blut zeigt folgenden Verlauf: um den Tag 110 bis 120 kommt es zu einem Anstieg auf ca. 4 pmol/ml, ein weiterer deutlicher Anstieg erfolgt zwischen den Tagen 230 und 260 auf ca. 15-30 nmol/l. Unter der Geburt kommt es bei einem physiologischen Abgang der Nachgeburt zu einem steilen Abfall auf das Basalniveau. Der Anteil der freien Östrogene, vor allem Estron, liegt mit Ausnahme des prä- und intrapartalen Zeitraumes um den Faktor 10-15 niedriger. Erst in den letzten beiden Wochen der Gravidität kommt es zu einem deutlichen Anstieg des freien Estrons, wobei die höchsten Konzentrationen mit 5-12 pmol/l in den letzten drei Trächtigkeitstagen erreicht werden. Unter der Geburt kommt es dann wie beim Estronsulfat zu einem steilen Konzentrationsabfall. In den letzten beiden Trächtigungswochen sind zusätzlich auch noch vermehrt Estradiol-17 α und β im mütterlichen Blut vorhanden, wenn auch in deutlich niedrigerer Konzentration als Estron (Schallenberger et al. 1985; Hoffmann et al. 1997; Schuler 2000). Im Unterschied zu Estradiol-17 α und Estron scheint beim Rind in der präpartalen Phase das Estradiol-17 β hauptsächlich aus dem Euter zu stammen (Janowski et al. 2002). Die plazentare Östrogensynthese konnte in den Kotyledonen (Hoffmann 1979; Evans und Wagner 1981; Matamoros 1994) und dort auf zellulärer Ebene in den Trophoblastriesenzellen nachgewiesen werden (Schuler et al. 2006a).

2.6 Funktionen der plazentaren Östrogene

Über die biologische Bedeutung der plazentaren Östrogene liegen beim Rind kaum gesicherte Informationen vor. Von Klinikern wird ihnen aufgrund ihrer ödeminduzierenden Wirkung am weiblichen Genitale eine wichtige Rolle bei der präpartalen Erweichung der weichen Ge-

burtswege zugesprochen. Auch für die Ansprechbarkeit des Myometriums unter der Geburt auf weheninduzierende Stimuli sollen sie von Bedeutung sein. Weiterhin spielen sie offensichtlich bei der präpartalen Euteranbildung eine Rolle (Convey 1974; Skarda et al. 1982). Das Auftreten plazentarer Östrogene ist jedoch nicht auf die Spätgravidität beschränkt. In den Fruchtwässern sind sie bereits unmittelbar nach Beginn der Plazentation nachweisbar (Eley et al. 1979). Somit ist ihre Bedeutung über einen weiten Zeitraum der Trächtigkeit unklar. Das Verständnis ihrer Funktion wird erheblich dadurch erschwert, dass sie mit Ausnahme der Endphase der Gravidität offensichtlich bereits in den Zellen sulfatiert und damit inaktiviert werden, in denen ihre Produktion aus Androgenen stattfindet, nämlich in den Trophoblastriesenzellen (Hoffmann et al. 1976; Hoffmann 1983; Mattioli et al. 1984; Brown et al. 1987; Hoffmann et al. 2001a, Schuler et al. 2006; Ushizawa et al. 2007).

Die Besonderheit der plazentaren gegenüber der ovariellen Östrogenproduktion besteht beim Rind darin, dass die plazentaren Östrogene im maternalen und fetalen Kreislauf mit Ausnahme des unmittelbaren prä- und intrapartalen Zeitraumes nahezu ausschließlich in konjugierter Form zirkulieren und dabei Konzentrationen erreichen, welche diejenigen brünstiger Rinder um ein Vielfaches übersteigen (Robertson and King 1979, Möstl et al. 1981, Hoffmann et al. 1997). Dies hat die eigene Arbeitsgruppe zu der Hypothese geführt, dass die plazentaren Östrogene eher lokale Regelfaktoren im graviden Uterus sind, denn als Hormone im klassischen Sinn wirken (Hoffmann et al. 2001, Hoffmann und Schuler 2002, Greven et al. 2007). Im Einklang mit dieser Hypothese wurde in den Plazentomen eine erhebliche Expression von Östrogenrezeptoren nachgewiesen, wobei die beiden Östrogenrezeptorisoformen, ER α und ER β , deutlich unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen.

Der Östrogenrezeptor α fand sich in den Plazentomen ausschließlich auf der maternalen Seite und dort in den Karunkelepithelzellen, Karunkelstromazellen und Kapillarpericyten (Schuler et al. 2002). Der Östrogenrezeptor β war dagegen in Karunkeln und Kotyledonen nachweisbar. Immunhistologisch fanden sich mit Ausnahme der Karunkelepithelzellen in allen Zelltypen der Plazentome entsprechende nukleäre Signale, wobei deren Intensität in den Trophoblastriesenzellen deutlich höher war als in den übrigen Östrogenrezeptor β -positiven Zellen (Schuler et al. 2005). Aufgrund dieser Expressionsmuster wurde vermutet, dass der Östrogenrezeptor α eine Rolle bei der Stimulation des Karunkelwachstums, sowie der überaus hohen Proliferation des Karunkelepithels spielen könnte (Schuler et al. 2000, 2002; Hoffmann und Schuler 2002). Wegen der Co-Lokalisation von Aromatase und Östrogenrezeptor β in den Trophoblastriesenzellen liegt die Vermutung nahe, dass die plazentaren Östrogene eine Rolle bei der Steuerung der Trophoblastriesenzelldifferenzierung haben könnten (Schuler et al.

2006a). Eine Beteiligung plazentarer Östrogene an der Steuerung der Trophoblastzelldifferenzierung wird auch beim Menschen vermutet (Bukovsky et al. 2003). Die Expression beider Östrogenrezeptorisoformen im Gefäßsystem deutet weiterhin darauf hin, dass die plazentaren Östrogene eine Rolle bei der Regulation von Bildung bzw. Funktionen plazentarer Gefäße spielen. Weitere potentielle Zielstrukturen der plazentaren Östrogene stellen beim Rind neben den Plazentomen auch das interkarunkuläre Endometrium und das Myometrium dar. Auch dort wurde die Expression von Östrogenrezeptoren nachgewiesen (Boos et al. 2006).

Zuverlässige Ergebnisse aus funktionellen Studien zu Effekten der plazentaren Östrogene liegen beim Rind bisher nicht vor. Janowski et al. (1996) behandelten Kühe vom 265. Trächtigkeitstag bis zur Geburt mit dem kompetitiven Östrogenrezeptorblocker Tamoxifen. Hierbei zeigten sich keinerlei Effekte hinsichtlich des Geburtsablaufes, des Nachgeburtsabganges, des maternalen Östrogenspiegels sowie der Plazentomhistologie. Allerdings ist nicht sicher, ob durch die durchgeführte Behandlung eine ausreichende Blockade der plazentaren Östrogenrezeptoren erzielt werden konnte.

Während beim Rind aussagefähige funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung der plazentaren Östrogene bisher gänzlich fehlen, konnte bei Labornagern und Primaten die Plazenta eindeutig als östrogenresponsives Organ identifiziert werden. So konnte beim Pavian gezeigt werden, dass Östrogene die Expression des Low Density Lipoprotein-Rezeptors und des P450 Side-chain Cleaving-Enzyms in der Plazenta stimulieren und dadurch die plazentare Progesteronproduktion steigern. Damit sollen sie indirekt an „typischen Progesteroneffekten“, wie der Unterdrückung von Myometriumskontraktionen und der lokalen Suppression des maternalen Immunsystems mitwirken. Untersuchungen an Primaten zeigten weiterhin, dass Östrogene auch an der Anpassung des utero-plazentaren Blutflusses, der Neovaskularisation der fetalen Plazenta und der Mammogenese beteiligt sind (Pepe und Albrecht 1995).

2.7 Bildung und mögliche biologische Bedeutungen sulfatierter Östrogene

Die Sulfatierung durch zytosolische Sulfotransferasen (SULT) stellt einen wichtigen Schritt in der Biotransformation vieler Pharmaka und Xenobiotika, aber auch endogener Substrate wie Schilddrüsenhormone, Neurotransmittern und Steroiden dar (Visser 1996; Kauffman 2004; Gamage et al. 2006). Im Vergleich zu freien Östrogenen sind die sulfatierten Formen polarer und somit besser wasserlöslich. Außerdem erhöht sich durch die Sulfatierung ihr Bindungsvermögen an Albumin (Bhavnani 1998). Dadurch können sie effektiver im Blut transportiert und im Kot oder Urin ausgeschieden werden. Mit der Sulfatierung ist auch eine Inaktivierung

der Östrogene verbunden, da sie nicht mehr mit den klassischen nukleären Östrogenrezeptoren interagieren können (Payne et al. 1973; Kuiper et al. 1997). Weiterhin führt die Konjugation zu einer Einschränkung des Verteilungsvolumens, da konjugierte Östrogene im Gegensatz zu den freien Formen Zellmembranen kaum durch passive Diffusion durchdringen können. Über den zellulären Import oder Export sulfatierter Östrogene durch mehr oder weniger spezifische, membranassoziierte Transportmechanismen lagen bisher kaum Informationen vor.

Obwohl die Sulfatierung einen wichtigen Mechanismus zur Inaktivierung und Ausscheidung von Östrogenen darstellt, können sulfatierte Östrogene nicht als reine Ausscheidungsprodukte betrachtet werden. Durch die Einwirkung einer Steroidsulfatase (StS) können sie wieder in freie Formen überführt und damit "reaktiviert" werden. So können lokal hohe Konzentrationen freier, aktiver Östrogene gebildet werden, die Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion des umliegenden Gewebes nehmen können ("Sulfatase Pathway" der Synthese freier Östrogene; s. Abschnitt 2.8).

Die Bildung sulfatierter Östrogene wird durch zytosolische Östrogensulfotransferasen katalysiert. Für die chemische Reaktion benötigen Östrogensulfotransferasen den Cofaktor 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat. Nach der chemischen Nomenklatur handelt es sich bei dieser Reaktion eigentlich um eine Sulfonierung und bei den Reaktionsprodukten folglich um Sulfonate (Kuss et al. 1994; Chapman et al. 2004). Da aber in der Literatur in diesem Zusammenhang die korrekten Begriffe kaum Anwendung finden, sollen auch in der eigenen Arbeit die allgemein üblichen Bezeichnungen Sulfatierung und Sulfate weiter verwendet werden.

Beim Menschen wurden bisher 10 Sulfotransferasen (SULTs) identifiziert, welche eine z.T. hohe Homologie und überlappende Substratspezifität aufweisen, wodurch in früheren Versuchen zu ihrer Charakterisierung eine erhebliche Verwirrung herrschte. Eine fundierte Nomenklatur der menschlichen Sulfotransferasen konnte erst vor relativ kurzer Zeit erstellt werden, nachdem entsprechende molekularbiologische Verfahren zur Verfügung standen. Für die SULT1E1 konnte eine hohe Affinität für Östrogene nachgewiesen werden, während die SULT2-Sulfotransferasen (A1, B1a und B1b) eine höhere Spezifität für neutrale Hydroxysteroiden aufweisen (Chapman et al. 2004). Die für die Sulfokonjugation von Steroiden infrage kommenden Sulfotransferasen unserer Haussäugetiere, sowie deren entsprechende Expressionsmuster sind bisher noch wenig charakterisiert. Beim Rind wurde aus der Plazenta eine Östrogensulfotransferase mit hoher Homologie zur menschlichen Östrogensulfotransferase (SULT1E1) kloniert (Nash et al. 1988). In Untersuchungen an Gewebehomogenaten bzw.

subzellulären Fraktionen konnte in Rinderplazentomen eine erhebliche Östrogensulfotransferaseaktivität nachgewiesen werden, wobei die gemessene Sulfatierung von Estron in den Kottyledonenpräparationen deutlich höher war als in den Präparationen aus Karunkelgewebe. Weiterhin waren die Aktivitäten im Cytosol um ein Vielfaches höher als in den Kern- bzw. Mikrosomenfraktionen (Mattioli et al. 1984, Möstl et al. 1986, Hoffmann et al. 2001a). Immunhistologisch und mittels In situ-Hybridisierung wurde die Östrogensulfotransferase in der Rinderplazenta in den Trophoblastriesenzellen nachgewiesen (Brown et al. 1987, Ushizawa et al 2007).

2.8 Steroidsulfatasen

2.8.1 Steroidsulfatase des Menschen

Die Nomenklatur der Steroidsulfatase (StS) ist in der Literatur vielfältig. Es gibt neben dem Begriff Steroidsulfatase (Dibbelt und Kuss 1983; Daniel und Chang 1990) auch die Begriffe Sterylsulfatase (Dibbelt et al. 1989; Dibbelt und Kuss 1991), Östrogensulfatase (Dibbelt und Kuss 1984) und Estronsulfatase (Benedetto et al. 1990; Evans et al. 1991). Daneben existiert noch die Arylsulfatase C. Strittig ist, ob es sich bei der Steroidsulfatase und der Arylsulfatase C um zwei verschiedene Enzyme (Dijkstra et al. 1987; Ruoff und Daniel 1991) oder um die s- bzw. f- Isoform (slow bzw. fast bei der elektrophoretischen Auftrennung) eines einzigen Enzyms handelt (Vaccaro et al. 1987; Chang et al. 1990; Dibbelt und Kuss 1991). Die s-Form der Arylsulfatase C ähnelt biochemisch stark der Steroidsulfatase (Burns 1983) und tritt sowohl zusammen mit der f-Form als auch solitär auf (Munroe und Chang 1987). Sie kann ebenso wie die Steroidsulfatase besonders gut aus der Plazenta isoliert werden, da sie hier in großen Mengen und ohne die f-Form vorkommt. Die f-Form der Arylsulfatase C unterscheidet sich von der s-Form und der Steroidsulfatase deutlich in ihren enzymatischen bzw. physiko-chemischen Eigenschaften, wie zu Beispiel durch die kaum nachweisbare Spaltung von Steroidsulfaten, pH-Optimum, Hitzestabilität und Antigenität (Munroe und Chang 1987; Shankaran et al. 1991). Systematisch werden Steroidsulfatase (EC.3.1.6.2) und Arylsulfatase C (EC.3.1.6.1) jedoch als getrennte Enzyme geführt.

Biochemisch handelt es sich bei der Steroidsulfatase um eine Sterylsulfatase bzw. um eine Sterylsulfat-Sulfohydrolase. Die Steroidsulfatase wandelt ein Steroidsulfat und ein Wassermolekül in ein freies Steroid und einen Sulfatrest um.

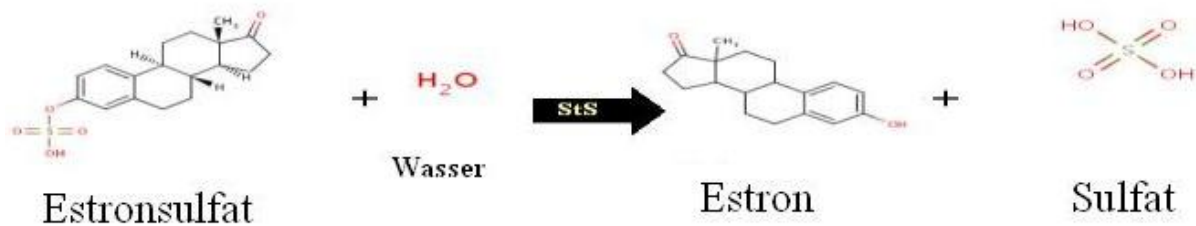


Abb. 3: Reaktionsgleichung für die Spaltung von Estronsulfat durch die Steroidsulfatase (StS)
http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php4?ecno=3.1.6.2

Zu ihren natürlichen Substraten zählen Cholesterinsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-Sulfat), Estronsulfat und Pregnenolonsulfat (Roy 1976; Noel et al. 1983). Die stärkste Aktivität zeigt die Steroidsulfatase bei der Spaltung vom Estronsulfat, die höchste Bindungsaffinität hat sie jedoch zum Pregnenolonsulfat (Chibbar und Mitchell 1990). Dehydroepiandrosteronsulfat, Estronsulfat und Pregnenolonsulfat können ihre Spaltung durch die Steroidsulfatase wechselseitig kompetitiv hemmen. Sie scheinen um die gleiche Steroidbindungstelle zu konkurrieren (Chibbar und Mitchell 1990).

Die Sequenz der humanen Steroidsulfatase wurde erstmals von Yen et al. (1987) aus cDNA der menschlichen Plazenta kloniert. Vom Gen sind 6366 Basenpaare bekannt, die sich in 10 Exone gliedern und über einen Bereich von 146 Kilobasenpaaren auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms erstrecken. 1752 Basenpaare davon kodieren für das 65,5 kDa große und aus 583 Aminosäuren bestehende Protein. Das Protein besitzt vier mögliche Glykosylierungsstellen, von denen mindestens zwei verwendet werden (Stein et al. 1989).

Als Besonderheit entgeht das Steroidsulfatase-Gen bei Frauen teilweise der typischen Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms (Mohandas et al. 1979; Shapiro et al. 1979; Mohandas et al. 1980). Die Aktivität des Genes auf dem zweiten X-Chromosom scheint jedoch eingeschränkt zu sein im Vergleich zum aktiven Homolog (Migeon et al. 1982; Lykkesfeldt et al. 1984a). Das Verhältnis von 2:1, das bei zwei vollständig aktiven Steroidsulfatasegenen bei der Frau im Vergleich zu einem aktiven Gen beim Mann zu erwarten wäre, wird nicht beobachtet. So beträgt das Steroidsulfatase-Aktivitätsverhältnis von Mann : Frau in Fibroblasten aus Zellkultur, 1:1,6 (Bedin et al. 1981; Chance und Gartler 1983; Vogel et al. 1984), in Leukozyten 1: 1,3 bis 1:1,5 (Epstein und Leventhal 1981; Jobsis et al. 1983; Lykkesfeldt et al. 1984b), in Haarwurzeln 1:1,04 bis 1:1,6 (Chance und Gartler 1983; Dancis et al. 1983), im Herzmuskel 1: 1,67 (Munroe und Chang 1987), Niere 1:1,62 (Munroe und Chang 1987), so-

wie in der Plazenta 1:1,3 bis 1:1,8 (Bedin et al. 1981; Lykkesfeldt und Bock 1981; Lykkesfeldt et al. 1981). Dies spricht dafür, dass die Aktivität des Genes auf dem zweiten X-Chromosom eingeschränkt ist und von Gewebe zu Gewebe variiert.

Die Steroidsulfatase kann erheblich in den Steroidmetabolismus eingreifen. Wie in Kapitel 2.7 dargestellt, sind sulfatierte Steroide deutlich besser wasserlöslich als freie Steroide, sie stellen eine Transport- und Ausscheidungsform für Steroide dar. Gleichzeitig verlieren die Steroide durch die Sulfatierung die Fähigkeit zur Interaktion mit den klassischen Steroidrezeptoren (Kuiper et al. 1997, Kauffman 2004, Gamage et al. 2006). Durch die Abspaltung des Sulfatrestes können Steroidsulfate wieder in rezeptoraktive freie Formen überführt oder als Prekursor in den Steroidmetabolismus eingeschleust werden. Der Steroidsulfatase kommt deshalb zusammen mit der Östrogensulfotransferase eine wichtige Aufgabe bei der Regulation steroidabhängiger Prozesse im Organismus zu (Miki et al. 2002). Desweiteren gibt es Hinweise, dass sie direkt in die Effizienz der Steroidsynthese eingreifen kann. In einem Experiment mit Zellen, die sowohl mit steroid acute regulation protein (StAR), Cytochrom P450 side chain cleaving enzyme (P450_{scc}) und Steroidsulfatase cotransfiziert worden waren, konnte gezeigt werden, dass das StAR-Protein in diesen dreifach transfizierten Zellen eine deutlich verlängerte Halbwertszeit und eine erhöhte Translationsrate aufwies, im Vergleich zu Zellen, die nur mit StAR und P450_{scc} doppeltransfiziert waren (Sugawara und Fujimoto 2004). Die Halbwertszeit und Syntheserate des StAR-Proteins scheint also durch die Anwesenheit von Steroidsulfatase in diesem Versuch verlängert worden zu sein.

Beim Menschen wurde die Steroidsulfatase wegen ihrer Rolle in einer geschlechtsgebundenen Erbkrankheit, der „X-linked Ichthyosis“, intensiv erforscht. Dieses Krankheitsbild hat eine Inzidenz von ca. 1:6000 bei Männern und tritt in allen ethnischen Gruppen auf (Shapiro 1985). Frauen sind in der Regel heterozygote Anlageträger ohne Krankheitssymptome. Ihre Leukozyten zeigen jedoch eine verringerte DHEA-Sulfat-Spaltung (Lowis und Oakey 1996). Die Steroidsulfatase-Defizienz beruht meistens auf Deletionen im Gen (Bonifas et al. 1987; Conary et al. 1987; Gillard et al. 1987; Yen et al. 1987), seltener auf Punktmutationen (Basler et al. 1992; Alperin und Shapiro 1997) oder posttranslationalen Veränderungen des Proteins (Shapiro et al. 1989). Gerade die Punktmutationen sind jedoch im Hinblick auf das Verständnis der biologischen Bedeutung der einzelnen Molekülregionen interessant (Sugawara et al. 2006). Schwangerschaften mit einem betroffenen männlichen Fetus sind diagnostisch erkennbar an den niedrigen Konzentrationen freier Östrogene im maternalen Blut (David et al. 1995). Ursache dafür ist, dass die humane Plazenta nicht in der Lage ist, den Prekursor DHEA selbst zu synthetisieren, da ihr die 17 α -Hydroxylase fehlt. Sie ist bei der Östrogensynthese de-

shalb darauf angewiesen, in der fetalen und maternalen Nebenniere gebildetes und über den Blutstrom in die Plazenta gelangendes DHEA-Sulfat zu desulfatieren und dann als Ausgangssubstanz für die placentare Östrogensynthese zu verwenden (Konzept der feto-maternale Einheit) (Diczfalusy 1964). Bei Schwangerschaften mit einem Steroidsulfatase-defizienten Fetus wird das DHEA-Sulfat aus dem fetalen bzw. maternalen Blut nur eingeschränkt oder überhaupt nicht von der Plazenta desulfatiert, wodurch die Effizienz der placentaren Östrogensynthese je nach Grad des Steroidsulfatasemangels reduziert ist. Die Schwangerschaftsdauer wird dadurch zum Teil verlängert, es kommt häufiger zu Wehenschwäche, seltener zu Fruchttod, Wachstumsverzögerungen des Fetus oder Geburtskomplikationen (Traupe und Happle 1983; Rizk und Johansen 1994; Keren et al. 1995). Die betroffenen Kinder entwickeln fischschuppenartige Hautveränderungen in Form von großen, braunen Borken, da Cholesterinsulfat, das als Zwischenzell-Kittsubstanz im Stratum corneum der Haut dient, nicht gespalten werden kann und sich anreichert. Hierdurch wird die normale Epithelabschilferung gestört (Ballabio 1995). Des weiteren kann es zu Hornhauttrübungen kommen und es gibt Hinweise auf eine erhöhte Inzidenz von Kryptorchismus und Hodenkrebs bei den Betroffenen (Lykkesfeldt et al. 1991).

Die Steroidsulfatase wurde in vielen Organen des adulten Menschen nachgewiesen. Dazu gehören Lunge, Aorta, Leber, Schilddrüse, Hoden und Uterus. Im Uterus konnte eine Zyklusabhängigkeit der Steroidsulfatase-Expression gezeigt werden. Dort war die Steroidsulfatase-mRNA besonders gehäuft in der mittleren sekretorischen Phase des weiblichen Zykluses zu finden. In Gehirn, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere, Haut und Muskel konnten Miki et al. (2002) dagegen keine Steroidsulfatase-Expression nachweisen. Dies widerspricht dem Steroidsulfataseaktivitätsnachweis anderer Autoren und dem klinischen Bild der Ichthyosis bei Patienten mit Steroidsulfatasedefizienz (siehe oben). Andere Autoren fanden Steroidsulfatase-mRNA und Aktivität im murenen Temporallappen des Gehirns und dort in Neuronen und Caja-Retzius-Zellen (Steckelbroeck et al. 2004). Im Zentralnervensystem sollen sulfatierte Steroide und freie Steroide gegensätzlich am GABA Rezeptor wirken (Park-Chung et al. 1999). DHEA-Sulfat zeigte im Mausversuch einen positiven Effekt auf das Erinnerungsvermögen (Flood et al. 1999). Eine neuronale Form der Steroidsulfatase könnte die Balance zwischen freien und sulfatierten Steroiden dort mit regulieren. Über eine vergleichbare Wirkung beim Menschen liegen jedoch keine Informationen vor.

Eine Steroidsulfatase-Expression wurde ebenfalls im Ovar in Stroma, Follikel und Corpus luteum beschrieben (Haning et al. 1990). In den Granulosazellen von Follikeln soll die Steroidsulfatase DHEA-Sulfat für die Synthese von Androstendion und Estradiol verfügbar machen

(Bonser et al. 2000). In den Epithelzellen des Eileiters war die Steroidsulfatase-Expression verstärkt in den sekretorischen Zellen während der frühen Lutealphase zu finden (Yanaihara et al. 2001).

In der männlichen Reproduktionsbiologie wird nicht nur eine Beteiligung der Steroidsulfatase an der Testosteronsynthese diskutiert. Auch bei der Reifung und Kapazitation der Spermien und bei der Akrosomenreaktion soll die Steroidsulfatase involviert sein (Langlais et al. 1981). So konnte der Einbau großer Mengen von Cholesterinsulfat in der Plasmamembran von Spermien, vor allem im Bereich der Akrosomenkappe, nachgewiesen werden. Dies könnte einen stabilisierenden Effekt auf die Plasmamembran haben und die Freisetzung von Akrosin, einem protolytischen Enzym, spezifisch hemmen (Roberts 1987). Im weiblichen Genitaltrakt kann die Steroidsulfatase zu einem Zusammenbruch der Akrosomenmembran und so zur Freisetzung der Akrosomenenzyme führen (Reed et al. 2005).

In den Dermalpapillen von Haarfollikeln soll die Steroidsulfatase DHEA-Sulfat hydrolysieren. Das gebildete DHEA soll dann zur Synthese von 5α -Dihydrotestosteron verwendet werden. Hierdurch soll die Steroidsulfatase an der Entwicklung der Alopecia androgenetica beteiligt sein (Hoffmann et al. 2001b). Steroidsulfatase wurde ebenfalls nachgewiesen in der Nebenniere (Munroe und Chang 1987; Miki et al. 2002), Hoden (Payne et al. 1971; Kawano et al. 1973; Miki et al. 2002), Hautfibroblasten (Bedin et al. 1981; Chance und Gartler 1983; Vogel et al. 1984), Leukozyten (Epstein und Leventhal 1981; Jobsis et al. 1983; Lykkesfeldt et al. 1984b), Milz (Munroe und Chang 1987), Darm (Munroe und Chang 1987), Skelettmuskel (Munroe und Chang 1987), Herzmuskel (Munroe und Chang 1987), Myoepithelzellen (Tobacman et al. 2002) und Fibroblasten der Brust (Newman et al. 2000).

Beim menschlichen Fetus fanden Miki et al. (2002) Steroidsulfatase-mRNA im Gehirn, Lunge, Herz, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Nebenniere, Schilddrüse, Thymus und Niere. Im Syncytiotrophoblasten der Plazenta konnten Salido et al. (1990) zum Ende des ersten und zu Beginn des zweiten Trimesters der Schwangerschaft eine höhere Steroidsulfatase-Expression nachweisen als im Zeitraum der Geburt. Mitchell et al. (1984) wiesen in Amnion, Chorion und Deciduazellen die Spaltung von Estronsulfat bzw. DHEA-Sulfat zum Zeitpunkt der Geburt nach.

Mittels immunelektronenmikroskopischer Methoden konnte die Steroidsulfatase in Fibroblastenkulturen aus menschlicher Haut auf subzellulärer Ebene im rauem endoplasmatischen Retikulum, Golgiapparat, Plasmamembranen, Endosomen und coated pits, nicht jedoch in den Lysosomen lokalisiert werden (Willemsen et al. 1988).

Eine besondere Bedeutung besitzt die Steroidsulfatase bei östrogenabhängigen Mammatumoren. Diese können ebenfalls eine Steroidsulfatase-Aktivität besitzen, mit der sie sulfatierte Prekursoren aus dem peripheren Blut für ihre eigene Steroidsynthese zugänglich machen oder Estronsulfat in freie Östrogen überführen und so für die Stimulation ihrer Proliferation nutzen ("Sulfatase-Pathway") (Santner et al. 1984, Santen et al. 1986, Nakata et al. 2003). Im Brustkrebsgewebe postmenopausaler Frauen hat man einen bis zu 2-40 fach erhöhten Östrogenspiegel gefunden im Vergleich zum peripheren Blut (Edery et al. 1981; Santen et al. 1986). Es konnte gezeigt werden, dass bei der intratumoralen Östrogensynthese der Sulfatase-Pathway wesentlich stärker beschritten wird als die de novo-Synthese freier Östrogene über die Aromatase (Santen et al. 1986). 89% der von Evans et al. (1994) untersuchten Brustkrebsproben waren Steroidsulfatase-positiv, unabhängig ob sie Östrogenrezeptoren exprimierten oder nicht. Es konnte auch gezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Steroidsulfatase-mRNA-Niveau in Brustkrebsgewebe und der Prognose für die Patientin gibt. Eine hohe Steroidsulfatase-mRNA-Expression erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lymphknotenmetastasen sowie eines Rezidivs des Tumors (Utsumi et al. 1999). In der Therapie hormonabhängiger Mammatumoren wurden bisher neben der chirurgischen Entfernung vor allem selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) und Aromataseinhibitoren eingesetzt (Howell 2001; Nakata et al. 2003; Eneman et al. 2004; Jordan und Brodie 2007). Seit wenigen Jahren werden Steroidsulfatase-Inhibitoren als neues Konzept in der Therapie menschlicher Mammakarzinome in klinischen Studien erprobt (Foster et al. 2006, 2007; Stanway et al. 2006; 2007; Woo et al. 2007). In vitro und in Tierversuchen hatten sich diese Substanzen als wirksam erwiesen (Foster et al. 2006, 2007 Stanway et al. 2006, 2007; Woo et al. 2007).

2.8.2 Steroidsulfatase bei anderen Spezies

Steroidsulfataseaktivitäten finden sich auch bei anderen Spezies. Dies reicht von den Säugetieren bis hin zu *Helix pomatia*, der Weinbergschnecke (Bleau et al. 1971).

Beim Meerschweinchen wurde Steroidsulfatase-Aktivität in folgenden Organen nachgewiesen: Hoden, Uterus, Plazenta, Chorion, Amnion, Lunge, Milz, Dünndarm, Ovar, Leber und Niere (Hobkirk et al. 1982). Aus der Plazenta und dem Endometrium isolierte Steroidsulfatase war in der Lage, Estronsulfat und Pregnenolonsulfat zu spalten. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium. Während es in der Gesamtplazenta, dem Chorion und dem Endometrium im Verlauf der Trächtigkeit zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg kam, war im Amnion ein deutlicher Abfall zu verzeichnen (Glutek und Hob-

kirk 1990). Die Steroidsulfatase-Aktivität im nicht-graviden Meerschweinchenuterus lässt sich nach Beobachtungen von Roblin et al. (1986) nicht durch Cortisongaben erhöhen. Vergleichbare Daten für die Meerschweinchenplazenta liegen nicht vor.

Beim Schaf wurden Steroidsulfatase-Aktivitäten in der Niere, der Plazenta und dem Gehirn nachgewiesen (Lakshmi und Balasubramanian 1979; Mathew und Balasubramanian 1982; Hobkirk und Cardy 1985; Purinton et al. 1999). Dwyer und Robertson (1980) berichten über einen Abfall der Aktivität während der Gravidität im Uterus, so dass eine mikrosomale Steroidsulfatase-Aktivität in der Spätgravidität, unter der normalen Geburt und bei der glucocorticoidinduzierten Geburt in der Plazenta kaum nachweisbar war (Mason et al. 1989). Wood (2005) postuliert, dass die Steroidsulfatase im fetalen Schafgehirn an der Einleitung der Geburt beteiligt ist. Nach seiner Theorie führen die hohen fetalen Östrogensulfatkonzentrationen zu deren Akkumulation im Gehirn des Fetus. Aufgrund der dort nachgewiesenen Steroidsulfatase können direkt in dem Gehirnbereich, der die fetale Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse steuert, sulfatierte Östrogene hydrolysiert werden. Die so gebildeten freien Östrogene können, laut seiner Theorie, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse so beeinflussen, so dass es zu einer vermehrten ACTH-Sekretion aus der Hypophyse kommt, wodurch sich der fetale Plasmacortisolspiegel erhöht. Dieser erhöhte Plasmacortisolspiegel soll dann die plazentare Östrogensynthese weiter steigern und somit den positiven Feedback-Kreis schließen, der schließlich mit der Weheninduktion und der Geburt des Lammes endet (Carnegie and Robertson 1978; Saoud und Wood 1997; Wood und Cudd 1997; Wood et al. 2001, 2003).

Beim Rhesusaffen wurden ähnlich wie beim Menschen Steroidsulfatase-Aktivitäten in einer Vielzahl von Organen gefunden: Nebenniere, Darm, Niere, Leber, Lunge, Fettgewebe, Hoden, Prostata, Samenblasendüse, Ovar, Myometrium, Endometrium, Eileiter, Cervix, Milchdrüse, Herz und Skelettmuskel. Die Steroidsulfatase war in der Lage, sowohl Estronsulfat als auch DHEA-Sulfat zu spalten (Martel et al. 1994).

Beim Eber, einem Tier mit einer hohen testikulären Östrogensynthese, konnten Steroidsulfataseaktivitäten in Homogenaten des Hodens und in geringerem Maße auch in Nebenhodenhomogenaten nachgewiesen werden (Rostalski 2005). Das Steroidsulfataseprotein konnte immunhistologisch in den Leydigzellen lokalisiert werden (Mutembei 2006). Auch in Uterushomogenaten gravider Sauen konnte Steroidsulfatase-Aktivität nachgewiesen werden (Dwyer und Robertson 1980).

Bei der Ratte wurde die Steroidsulfatase in Leber (Bleau et al. 1971; Dolly et al. 1972), Niere (Kawano und Aikawa 1987), Gehirn (Iwamori et al. 1976b) und dort im Plexus choroideus,

der Adenohypophyse und der Zirbeldrüse (Kawano und Aikawa 1987), Prostata (Huot und Shain 1988), sowie Uterus (Pack und Brooks 1970) beschrieben. Hemmt man die Steroidsulfatase im Rattengehirn, kommt es zu veränderten Gedächtnisleistungen der Tiere (Li et al. 1997). Die Steroidsulfatase der Ratte spaltet Estronsulfat, Cholesterinsulfat, Pregnenolonsulfat und DHEA-Sulfat (Iwamori et al. 1976a, 1976b).

Auch beim Kaninchen wurde Steroidsulfatase im Uterus und dem fetalen Teil der Plazenta gefunden (Challis und Greenblatt 1980; Holinka und Gurspide 1980).

Bei der Maus wurde die Steroidsulfatase in Lunge, Leber, Niere und Milz gezeigt. Im Mäuseembryo fand sich Steroidsulfatase im Gehirn (Compagnone et al. 1997). Auch beim Auftreten von Ossifikationskernen wurde im fetalen Knorpel Steroidsulfatase-mRNA beobachtet (Compagnone et al. 1997).

Beim Rind wurde Steroidsulfatase-Aktivität im Hypothalamus und dem Mittelhirn (Park et al. 1997) und bei trächtigen Tieren in den Plazentomen und im interkarunkulären Endometrium nachgewiesen (Janszen 1995). In den Plazentomen war die Aktivität vor allem auf der maternalen Seite und nur im geringerem Maße im fetalen Anteil zu finden (Mattioli 1984; Möstl 1986, Hofman et al. 2001a). Während der Trächtigkeit beobachtete Hoffmann et al. (2001a) relativ konstante Steroidsulfatase-Aktivitäten in Kotyledonen- bzw. Karunkelhomogenaten. Die gemessene Enzymaktivität sank jeweils unter der Geburt signifikant ab. Janszen et al. (1995) berichten dagegen über einen Anstieg der Steroidsulfatase-Aktivität in den Plazentomen im Zusammenhang mit der Geburt. Bei neugeborenen Kälbern werden sehr selten Ichthyosis-Fälle beobachtet. Ein Zusammenhang mit der humanen Steroidsulfatasedefizienz ist beim Rind jedoch nicht bekannt (Dahme und Weiss 1999).

2.9 Sodium dependent organic anion transporter (Soat)

Dieser Transporter wurde erstmals 2004 von Geyer et al. bei der Ratte entdeckt und beschrieben. Mittlerweile wurde der Soat auch beim Menschen und der Maus vollständig kloniert (Genbank Accession no. EF437223.1 und NM_029415). Des Weiteren wurden bereits 305 bis 573 Basenpaare große Fragmente der Soat-Nukleotidsequenz bei Pferd, Hund und Rind ermittelt und in die Genbank eingetragen. Der Nachweis dieser Soat-Fragmente ist im Hoden der jeweiligen Tierart geführt worden (Accession no. DQ409210, DQ409211, DQ409212). Weitere Informationen existieren bei diesen Tierarten zurzeit nicht.

Der Soat ist unter der Bezeichnung SLC10A6 in die Familie der Solute Carrier Family 10 eingeordnet worden. Ursprünglich enthielt diese Familie nur zwei Mitglieder, das Natrium-

Taurocholat Cotransport Polypeptid (NTCP oder SLC10A1) und den Apical Sodium Dependent Bile Salt Transporter (ASBT oder SLC10A2). Sie transportieren natriumabhängig Gallensäuresalze in Leberzellen (NTCP) bzw. in Gallengangepithelzellen, Enterozyten des Ileums und in Nierenzellen des proximalen Tubulus (ASBT) und haben somit entscheidenden Einfluss auf die Gallensäurezirkulation im enterohepatischen Kreislauf (Hagenbuch und Dawson 2004). Diese beiden Transporter kommen in Tieren, Pflanzen und Bakterien vor und hatten bereits 2004 über 50 bekannte Mitglieder (Hagenbuch und Dawson 2004). Der Soat wurde nach seiner Entdeckung wegen seiner hohen Nukleotidsequenzhomologie mit dem ASBT (ca. 70%) und der sehr ähnlichen Genstruktur in die Familie SLC10 eingeordnet. Funktionell unterscheidet er sich jedoch deutlich vom NTCP und ASBT, denn er transportiert nach derzeitigem Kenntnisstand keine Gallensäuresalze (Ausnahme: Tauroolithcholinsäure-3-sulfat beim humanen Soat), sondern sulfatierte Steroide wie Estronsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-Sulfat) und Pregnenolonsulfat zusammen mit Natriumionen. Dies macht ihn in allen Organen mit Steroidogenese (z.B. Hoden, Plazenta, Nebenniere) zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Aufnahme von sulfatierten Steroidprecursoren in die Zelle (Geyer et al. 2006).

Relativ gut untersucht ist der Soat bei der Ratte. Die entsprechende Sequenz besteht aus einem Open Reading Frame (ORF) von 1113 bp, deren 6 Exone auf dem Chromosom 14 lokalisiert sind. Sie kodieren für ein Protein mit 370 Aminosäuren, das eine Homologie zu dem Asbt und Ntcp der Ratte von 42% bzw. 31% zeigt. Das von der Arbeitsgruppe Geyer (2004) favorisierte Membrantopographiemodell stellt das Protein so dar, dass es mit neun Transmembrandomänen in die Zellmembran eingebunden ist, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär zu liegen kommen. Bei der Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Soat Estronsulfat und DHEA-Sulfat transportiert, nicht aber Taurocholat, Östradiol-17 β -glucuronid oder Ouabain. Eine Expression dieses Transporters konnte in Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Lunge, Muskel, Milz, Hoden, Dünndarm und Colon der Ratte nachgewiesen werden (Geyer et al. 2004).

Der ebenfalls aus sechs Exonen bestehende open reading frame des menschlichen Soats umfasst 1134 bp, wobei im Genom die Exone dem Chromosom 4 zugeordnet wurden. Die menschliche Soat-Sequenz kodiert für ein Protein mit 377 Aminosäuren. Das Protein mit einem angehängten Flag-Tag ist 46 kDa groß und glykosyliert. Nach Abspaltung der Zuckerseitenketten sinkt das Molekulargewicht auf 42 kDa. Für das Protein wurden ein 7-, 8-, und 9-Transmembrandomänenmodell errechnet. Geyer et al. (2007) favorisierten jedoch das 7-Transmembrandomänenmodell, bei dem der N-Terminus extrazellulär liegt und der C-

Terminus intrazellulär. Besonders viel Soat-mRNA wurden im Hoden, der Plazenta und dem Pankreas des Menschen gefunden. Geringere Mengen waren aber auch im menschlichen Herz, Lunge und Milchdrüse nachweisbar. Der humane Soat wurde stabil in HEK293-Zellen transfiziert. In Transportstudien an diesen transfizierten Zellen wurde gezeigt, dass der Soat Estronsulfat (K_m 12,0), DHEA-Sulfat (K_m 28,7) und Pregnenolonsulfat (K_m 11,3) natriumabhängig transportiert, aber keine Gallensäuren (Ausnahme Taurocholinsäuresulfat). Der Transport konnte von mehreren nichtsteroidalen Organosulfaten gehemmt werden (Geyer et al. 2007).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Probenentnahme

Die Gewinnung von Plazentomen erfolgte am Schlachthof Giessen. Verwendet wurden die Uteri 24 kommerziell geschlachteter, trächtiger Rinder. Nach Eröffnung des Uterus wurden 3-5 Plazentome aus der Mitte des fruchttragenden Horns entfernt. Ein Teil davon wurde für die Dauer des ca. 30-minütigen Transportes zum Labor in eiskaltem PBS gelagert, der andere Teil unmittelbar nach der Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Labor wurde das Probenmaterial dann weiterverarbeitet und konserviert. Das schockgefrorene Gewebe wurde bis zur Gewinnung von RNA und Proteinen bei -80°C gelagert. Das in kaltem PBS transportierte Gewebe wurde so zugeschnitten, dass sich im Abstand von 0,5-1,0 cm mehrere parallele Längsschnitte von der Chorionplatte bis zum Karunkelstiel durch die gesamte Höhe der Interdigitationszone des Plazentoms ergaben. Diese Gewebstücke wurden 24 Stunden lang in 4%iger, neutralgepufferter Formaldehydlösung (Formol nach Lilli) fixiert und dann ca. 5-6 Tage lang in 0,1 M Phosphatpuffer gelagert, der alle 3 Tage gewechselt wurde. Mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 24 Stunden in 30%, 50%, 70%, 100% Ethanol) wurde das Gewebe entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet.

Das Stadium der verwendeten Graviditäten vom Schlachthof wurde anhand der gemessenen Scheitel-Steißlänge (SSL) des Fetus unter Verwendung der Formel nach KELLER errechnet (Schnorr 1996):

$$\text{geschätzter Trächtigkeitstag} = 28(\sqrt{\text{SSL} + 1} - 1)$$

Zur Beurteilung präpartaler Vorgänge in der Plazenta wurden vier tragende Kühe mit bekanntem Besamungsdatum angekauft. Um bei der Probenentnahme den Zeitraum der präpartalen Luteolyse zu treffen, wurden in den letzten beiden Trächtigkeitswochen im 8 Stunden-Abstand Blut genommen und der Progesteronwert bestimmt (ACS:180 Bayer-Progesterone-ACS-Kit, Fernwald). Sobald der Progesteronwert die Marke von 1,5 ng/ml (4,8 nmol/l) unterschritt, wurde eine Sectio cesarea durchgeführt (Tag 273-282) und dabei einzelne Plazentome entfernt. Keines dieser Tiere zeigte zum Zeitpunkt des Eingriffs Anzeichen von Wehen. Bei einem Tier konnte aufgrund eines technischen Problems am Tag 282 kein Progesteronwert gemessen werden, hier wurde die Sectio cesarea aufgrund von Zeichen der nahenden Geburt (Milcheinschießen in die Zitzen, Verflüssigung des cervikalen Schleimpfropfs, hochgradiges Vulvaödem) durchgeführt. Die nachträgliche Progesteronmessung ergab jedoch, dass der Progesteronabfall zum Zeitpunkt der Probennahme noch nicht eingetreten war. Deshalb wur-

de dieses Tier der Gruppe der hochträchtigen Rindern (drittes Trimester der Gravidität) zugeordnet.

Zusätzlich wurden von drei Tieren mit termingerechter Geburt, spontanem Geburtsbeginn und Dystokie infolge relativer oder absolut zu großer Frucht im Rahmen der medizinisch indizierten Sectio cesarea Plazentome entnommen und der Geburtsgruppe zugeordnet. Die entwickelten Kälber waren in allen Fällen matur und vital.

Die Versuchstiere wurden jeweils in eine der vier folgenden Versuchgruppen eingeordnet: zweites Trimester der Trächtigkeit (errechneter Trächtigkeitstag 91-180), drittes Trimester der Trächtigkeit (errechneter Trächtigkeitstag 181-260), präpartal (keine äußerlichen Anzeichen der Geburt, aber Progesterongehalt im maternalen, peripheren Blut unter 1,5 ng/ml), Geburt (Spontangeburt).

Die Probengewinnung von lebenden Tieren war vorab beim Regierungspräsidium Giessen angezeigt und genehmigt worden (Aktenzeichen II 25.3 – 19c 20/ 15cG/18/14).

3.2 Gewinnung von RNA

Tiefgefrorene Gewebestückchen wurden in Alufolie verpackt und mit Hammerschlägen grob vorzerkleinert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Gewebetrümmer wurden in einen auf -80°C vorgekühlten, sterilen Möser überführt und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mittels Pistill pulverisiert. Ca. 0,1 g Gewebepulver wurden in je ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß umgefüllt, sofort mit 1 ml Trizol versetzt und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nach einer 10-minütigen Ruhephase auf Eis wurden 200 µl eiskaltes Chloroform dazupipettiert, das Gefäß kurz geschüttelt, 5 min. gewartet und dann zentrifugiert (21.000 g/15 min., 4°C). Es entstanden 3 Phasen. In der obersten, farblosen, wässrigen Phase befand sich die RNA, in der weißen Intermediärphase Zelltrümmer und Lipide und in der untersten, rosa gefärbten Phase DNA und Proteine. Vorsichtig wurde die oberste Phase abgesaugt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die RNA-Phase wurde auf Grund ihrer Instabilität sofort weiterverarbeitet. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurde zuerst der oben beschriebene Chloroform-Zentrifugationsschritt mit der RNA-Phase wiederholt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde 1:1 mit eisgekühltem Isopropanol versetzt, geschüttelt, und mindestens 30 min. lang bei -20°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (21.000 g/10 min., 4°C) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde dann mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol versetzt, 10 min. gewartet, zentrifugiert (21.000 g/10min, 4°C) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde dann wiederholt. Anschlie-

ßend wurde das Pellet bei Raumtemperatur (RT) trocknen lassen und mit 50 µl autoklaviertem Wasser mit RNase-Inhibitor (1 U/µl) 5-10 min. im Wasserbad bei 70°C gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde eine 1:100-Verdünnung der RNA-Präparation mit autoklaviertem Wasser hergestellt und diese in UV-Küvetten ins Photometer eingesetzt. Gemessen wurde die Extinktion bei 260 nm. Als Leerwert diente autoklaviertes Wasser. Anschließend wurde ein Aliquot einer Arbeitsverdünnung mit einer RNA-Konzentration von 100 ng/µl hergestellt und Stammlösung bei – 80°C und Arbeitsverdünnung bei –20°C gelagert.

3.3 PCR

3.3.1 DNase-Behandlung

Vor jeder reversen Transkription wurde eine DNase-Behandlung der RNA-Präparation durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse in der PCR durch DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt. Zunächst wurde ein DNase-Mix hergestellt:

Tab.1: Zusammensetzung des DNase-Mixes

Komponente	Volumen	Stammlösung
MnCl ₂	1 µl	10 mM
PCR-Puffer	1 µl	10x
DNase I, RNase frei	1 µl	10 U/µl
RNase-Inhibitor	0,25 µl	40 U/µl

3,25 µl des DNase-Mixes wurden mit 6,25 µl RNA-Arbeitsverdünnung (100 ng RNA/µl) in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vermischt und wie folgt im Thermocycler inkubiert:

Tab. 2: Inkubationsprotokoll für die DNase-Behandlung

Temperatur	Dauer
37°C	10 min.
75°C	5 min.
4°C	bis Ende

Anschließend musste die so behandelte RNA sofort weiter für die reverse Transkription verwendet werden, da sie relativ instabil war.

3.3.2 Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese wurde die DNase-behandelte RNA (s. Kapitel 3.3.1.) verwendet. Das folgende Protokoll ist angelehnt an das vom Hersteller des benutzten RT-PCR Core Kits (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) empfohlene Verfahren. Der RT-Mastermix setzte sich wie folgt pro Ansatz zusammen:

Tab. 3: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

Komponente	Volumen	Stammlösung
MgCl ₂	2 µl	25 mM
PCR-Puffer	1 µl	10 x
Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix	4 µl	10 mM
Random Hexamers	0,5 µl	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5 µl	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl	50 U/µl

8,5 µl RT-Mastermix und 1,5 µl DNase behandelte RNA wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß gemischt und nach folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

Tab. 5: Inkubationsprotokoll für die reverse Transkription

Temperatur	Dauer
21°C	8 min.
42°C	15 min.
99°C	5 min.
5°C	5 min.
4°C	bis Ende

Nach der Abkühlung auf 4°C wurde die cDNA entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.3.3 Qualitative PCR

Der Ansatz für eine qualitative PCR bestand aus einem Pufferprämix, je einem genspezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, cDNA der zu untersuchenden Probe und einer DNA-Polymerase. Die Primer wurden mit Hilfe der Programme Oligo Analyzer 1.0.2 sowie Oligo Explorer 1.1.0. (Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, Finnland) ausgewählt. Als Quellsequenzen wurden entweder bereits veröffentlichte Sequenzen aus der Genbank, von anderen Spezies selbst mit dem Programm Bioedit (Hall 1999) erstellte Konsensussequenzen oder eigene Sequenzierungsergebnisse verwendet. Alle Primer wurden zusätzlich mittels Blast an den jeweils aktuellen Rindergenomdaten überprüft, um die Bindung an weitere Gene zu vermeiden. Die ausgewählten Primerpaare wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) bzw. von Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) synthetisiert. Bei jedem Versuchsansatz wurde als Negativkontrolle eine Präparation verwendet, bei der die RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung durch autoklaviertes Wasser ersetzt worden war. Gleichzeitig wurde als Positivkontrolle ein bereits erprobtes und bewährtes Primerpaar für das Housekeeping Gene β -Aktin verwendet (Shemesh et al. 1997). Der Prämix für einen PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 6: Zusammensetzung des Prämixes für einen PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen	Stammlösung
MgCl ₂	2 μ l	25 mM
PCR-Puffer	4 μ l	10 x
autoklaviertes Aqua bidest.	32,75 μ l	---

Dieser Prämix wurde zum PCR-Mix weiterverarbeitet. Dazu wurden für einen PCR-Ansatz verwendet:

Tab. 7: Zusammensetzung des PCR-Mixes für einen Reaktionsansatz

Komponente	Volumen	Stammlösung
PCR-Prämix	38,75 μ l	---
Vorwärtsprimer	0,5 μ l	20 pmol/ μ l
Rückwärtsprimer	0,5 μ l	20 pmol/ μ l
Amplitag [®] Gold Polymerase	0,25 μ l	5 U/ μ l

Alle Komponenten wurden gründlich durchmischt. Dann wurden pro Ansatz 40 μ l PCR-Mix mit 10 μ l DNase-behandelter cDNA in einem 0,5 μ l Eppendorfgefäß vermengt und nach folgendem Basisprogramm im Thermocycler inkubiert:

Tab. 8: Inkubationsprotokoll für die PCR-Reaktion

Programmschritt	Temperatur	Dauer
1: Initiale Denaturierung	94°C	1 min.

Beginn der Zyklen

2: Denaturierung	94°C	10 min.	39 Wiederholungen
3: Primeranlagerung	Mittlere Schmelztemperatur der Primer	2 min.	
4: Elongation	72°C	1-3 min.	

Ende der Zyklen

5: Finale Elongation	72°C	6 min.
6: Bis zur Entnahme	4°C	

Schritt 1 diente der initialen Denaturierung und der Aktivierung der verwendeten Hot-Start-Polymerase. Schritte 2-4 wurden 39 Mal wiederholt, bevor es mit Schritt 5 weiterging. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach der Entnahme aus den Cyclern direkt mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.4) analysiert oder bei –20°C gelagert.

3.3.4 RACE-PCR

Die Rapid Amplification of cDNA Ends PCR (RACE-PCR) diente dazu, ausgehend von einem kurzen, bereits bekannten Stück einer mRNA-Sequenz, deren 5'- und 3'-Enden zu ermitteln.

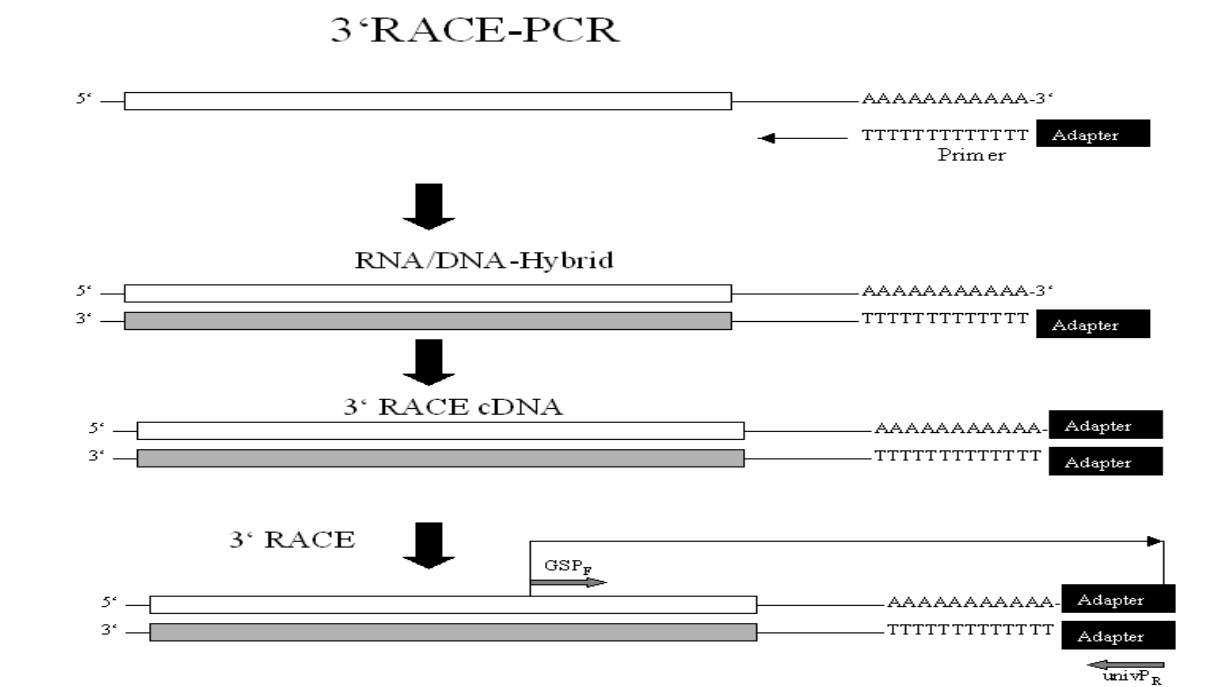


Abb. 4: Schematische Übersicht über das Prinzip der 3'-RACE-PCR.

univP_R: Universal-Rückwärtsprimer; GSP_F: genspezifischer Vorwärtsprimer

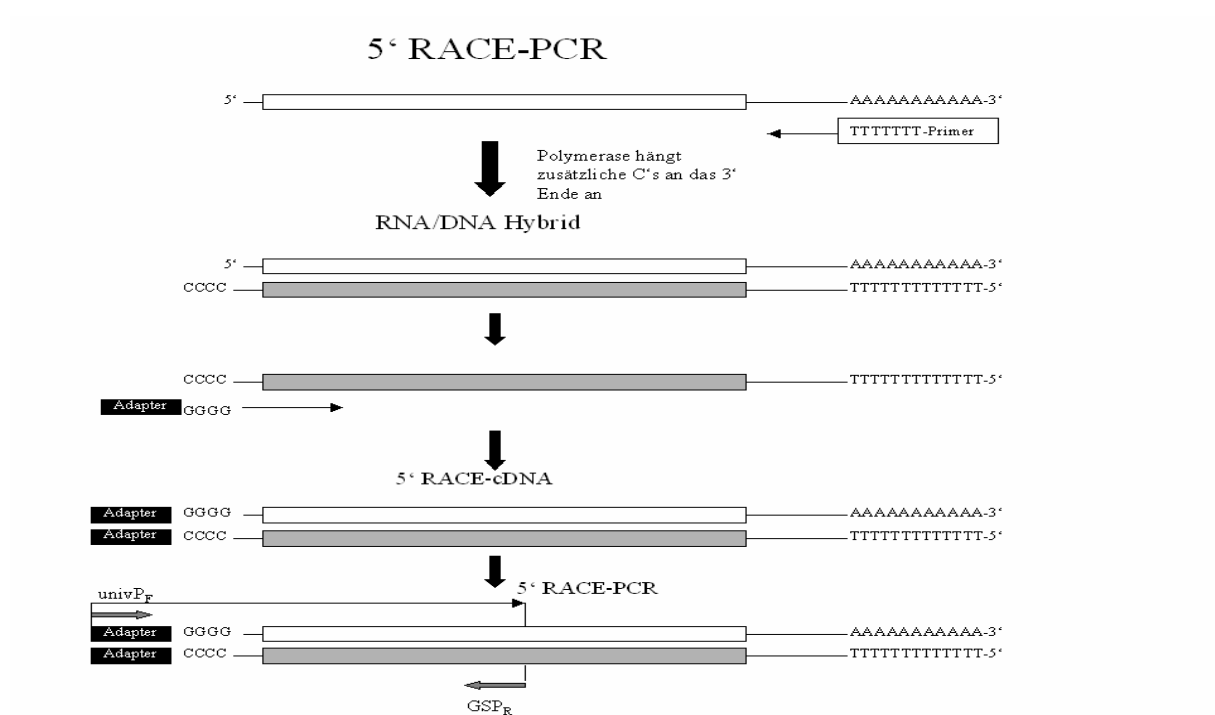


Abb. 5: Schematische Übersicht über das Prinzip der 5'-RACE-PCR.

univP_F: Universal-Vorwärtsprimer; GSP_R: genspezifischer Rückwärtsprimer

Die cDNA's für die 3'- und die 5'-RACE-PCR wurden getrennt hergestellt, da sie unterschiedliche Modifikationen an ihren UTR-Enden benötigten. Am 3'-Ende einer Sequenz findet man einen A-Cluster, der als Poly-A-Tail bezeichnet wird. Bei der Synthese der cDNA für die 3'-RACE-PCR via reverser Transkription (s. Abb. 4) befindet sich am 3'-Ende des Syntheseprimers, der am Poly-A-Tail der mRNA band, zusätzlich ein Adapter. Dieser Adapter wurde bei der reversen Transkription an die entstehende 3'-RACE cDNA angefügt und diente später als Bindungsort für den Universalprimer bei der RACE-PCR. Bei der Synthese der cDNA für die 5'-RACE-PCR (s. Abb. 5) musste ebenfalls ein Adapter angefügt werden, jedoch am 5'-Ende der neuen cDNA. Der Syntheseprimer band wie gerade beschrieben am Poly-A-Tail der Sequenz. Nach dem Erreichen des 5'-Endes der Matrize bei der Synthese fügte die Polymerase zusätzliche Nukleotide, vor allem Cytosine, in 3'-Richtung an den neusynthetisierten Strang an. Im nächsten Schritt löste sich dieser modifizierte Strang vom Original ab und ein Primer mit einer poly-G-Sequenz und einem Adapter band an das 3'-Ende des modifizierten Strangs. Im Zuge der reversen Transkription hatte nun der entstehende Strang ein poly-G-Muster und einen Adapter am 5'-Ende.

Bei der 3'-RACE-PCR band nun ein genspezifischer Primer an dem bereits bekannten Teil der Sequenz und diente als Vorwärtsprimer. Der Rückwärtsprimer wurde als Universalprimer bezeichnet und band an dem am 3'-Ende der cDNA angehängten Adapter (Abb. 4). Bei der 5'-RACE-PCR war die Verteilung der Primer genau umgekehrt, der genspezifische Primer stellt der Rückwärtsprimer dar, während der Universalprimer am angehängten Adapter des 5'-Endes der cDNA band (Abb. 5). Es folgt ein Inkubationsprogramm im Thermocycler, das in seinem Aufbau dem in Kap. 3.4.3 beschriebenen PCR-Programm entsprach. Allerdings lag das Temperaturoptimum der verwendeten RACE-Polymerase etwas höher als das der Ampitaq Gold[®] und die Elongationszeit wurde mit 3 min. veranschlagt, da die Länge der mitsynthetisierten 3' bzw. 5' UTR schwer einzuschätzen war (Tab. 10).

Zur Durchführung der modifizierten cDNA-Synthese und der RACE-PCR wurde das SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech) in Anlehnung an die Herstellerangaben verwendet. Der Mix zur Synthese der cDNA für die 3' bzw. 5' RACE-PCR enthielt folgende Komponenten:

Tab. 9: Zusammensetzung des Mixes für die cDNA-Synthese zur Verwendung in der 5'- bzw. 3'-RACE-PCR.

Komponente	cDNA-Synthese für 3'-RACE	cDNA-Synthese für 5'-RACE
Oligo-dT-Primer	-	1 µl
BD SMART II A oligo	-	1 µl
Oligo-dG-Primer	1 µl	-
autoklaviertes Wasser	1 µl	-
5x First-Strand Puffer	2 µl	2 µl
Dithiothreitol (20mM)	1 µl	1 µl
dNTP-Mix (10mM)	1 µl	1 µl
BD PowerScript Reverse Transkriptase	1 µl	1 µl
RNA (200ng/µl)	3 µl	3 µl

Die Komponenten wurden sorgfältig vermischt, 90 min. lang bei 42°C im Thermocycler inkubiert und die Reaktion durch eine 7 minütige Erhitzung auf 72°C abgestoppt. Die so gewonnene cDNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei –20°C gelagert.

Der RACE-PCR-Mix bestand aus folgenden Bestandteilen:

Tab. 10: Zusammensetzung des 5' - bzw. 3' -RACE-PCR-Mixes für jeweils eine Reaktion

Substanz	cDNA-Synthese für 3'-RACE	cDNA-Synthese für 5'-RACE
autoklaviertes Wasser	34,5 µl	34,5 µl
10x BD Advantage 2 PCR Puffer	5 µl	5 µl
dNTP-Mix (10mM)	1 µl	1 µl
50x BD Advantage 2 Polymerase Mix	1 µl	1 µl
Universalprimer	5 µl	5 µl
Genspezifischer Vorwärtsprimer (10pmol/µl)	1 µl	-
Genspezifischer Rückwärtsprimer (10pmol/µl)	-	1 µl
3'-RACE cDNA	2,5 µl	-
5'-RACE cDNA	-	2,5 µl

Für die RACE-PCR wurde folgendes Temperatur-Zeit-Manangment im Thermocycler gewählt:

Tab. 11: Inkubationsprotokoll für die RACE-PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94°C	1 min.	
Beginn der Zyklen			
Denaturierung	94°C	1 min.	39 Wiederholungen
Primeranlagerung	65°C	2 min.	
Elongation	72°C	3min.	
Ende der Zyklen			
Finale Elongation	72°C	10 min.	
Bis zur Entnahme	4°C		

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.4) der Größe nach aufgetrennt, ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert (siehe Kap. 3.5) und durch Klonierung in *E. coli* vermehrt (siehe Kap. 3.7), um genügend Material für die Sequenzierung zu erhalten. Durch das Überlappen der so erhaltenen Fragmente mit dem bereits bekannten Mittelteil der Sequenz konnte der open reading frame des Zielgenes vervollständigt und zusätzlich Teile der angrenzenden 5'- und 3'-UTR ermittelt werden.

3.3.5 Real-Time RT-PCR

Zur Messung der Expression der Zielgene Steroidsulfatase und Soat auf mRNA-Ebene, wurde jeweils ein semiquantitatives Real-Time RT-PCR-Verfahren angewendet. Hierbei wurde die relative Genexpression im Vergleich zu einem Kalibrator nach Normalisierung der Proben bezüglich eines Referenzgens (Housekeeping Gene) ermittelt. Als Kalibrator wurde die Probe mit der niedrigsten Zielgenexpression verwendet. Als Referenzgen diente GAPDH. Die Real-Time RT-PCR (Taqman-Methode) funktioniert folgendermaßen: Zunächst wählt man ein geeignetes Primerpaar aus. In den Sequenzbereich zwischen den Primern platziert man dann die Sonde. Primer und Sonde müssen genspezifisch sein. Wenn möglich, sollte die Sonde auf einer Exon-Exon-Grenze der mRNA sitzen, um eine Reaktion mit genomischer DNA auszuschließen. Ist dies nicht machbar, so muss die RNA vor dem Umschreiben in cDNA mit DNase behandelt werden (siehe Kap 3.4.1). Die Sonde ist an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, am anderen Ende mit einem Quencher versehen. Solange sich Farbstoff und Quen-

cher in enger räumlicher Nähe befinden, absorbiert der Quencher die bei Anregung freiwerdende Energie des Fluoreszenzfarbstoffs und unterdrückt so dessen Fluoreszieren. Bei der PCR binden zunächst Primer und Sonde an der cDNA (Abb. 6). Die Taq-Polymerase verlängert ausgehend von den gebundenen Primern den komplementären Strang und stößt dabei auf die Sonde. Da die Taq-Polymerase eine Nukleaseaktivität hat, baut sie nun die gebundene Sonde ab. Bei dem Abbau der Sonde werden Fluoreszenzfarbstoff und Quencher freigesetzt. Da der Quencher nun nicht mehr das Fluoreszieren des Farbstoffes verhindern kann, entsteht ein Fluoreszenzsignal, das von der Messeinrichtung des Cyclers detektiert wird. Die Signalstärke ist dabei proportional zur PCR-Produktzunahme.

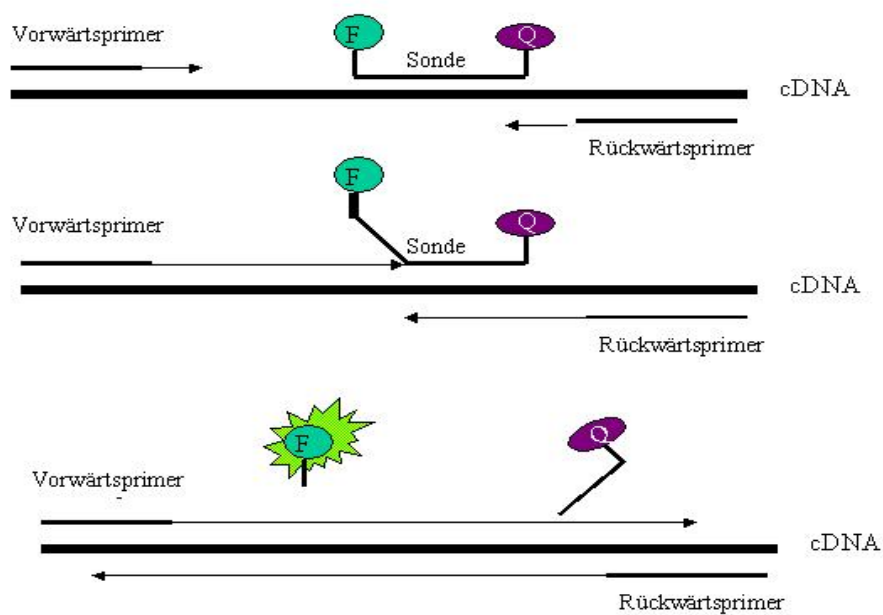


Abb. 6: Prinzip der TaqMan-Methode: Erst wenn die Sonde während der PCR im Rahmen der Strangverlängerung abgebaut wird und sich der Farbstoff (F) vom Quencher (Q) entfernen kann, erhält der Farbstoff seine Fähigkeit zur Aussendung eines Fluoreszenzsignals zurück.

In einem Vorversuch wurde eine vergleichbare Effizienz der Primer-Sonden-Kombination für das jeweilige Zielgen im Vergleich zum bereits etablierten System für das Housekeeping Gene bestätigt. Dazu wurden Real-Time RT-PCRs mit sich verdoppelnden RNA-Mengen für das Housekeeping Gene und das Zielgen durchgeführt. Hierbei müssen die erhaltenen Reaktionskurven möglichst parallel verlaufen, so dass gewährleistet ist, dass die Amplifi-

kation von Zielgen und Housekeeping Gene proportional zu einander verlaufen und damit vergleichbar sind. Dieser Vorversuch wurde sowohl für die Steroidsulfatase-GAPDH und die Soat-GAPDH- Real-Time PCR-System durchgeführt und bestätigte die Eignung beider Systeme für dieses PCR-Verfahren. Basierend auf diesem Vorversuch wurde auch die in die Probenansätze einzubringende RNA-Menge für den Hauptversuch festgelegt.

Bei der Versuchsdurchführung wurde zunächst für jedes zu detektierende Gen ein separater Mix erstellt. Er beinhaltet pro Ansatz:

Tab. 12: Zusammensetzung des Mixes für eine Real-Time RT-PCR-Reaktion

Komponente	Volumen	Stammlösung
qPCR Mastermix (Eurogentec)	12,5 µl	2x
autoklaviertes Wasser	3,5 µl	
Vorwärtsprimer	1,5 µl	5 µM
Rückwärtsprimer	1,5 µl	5 µM
Sonde	1,0 µl	5 µM
DNase behandelte cDNA	5 µl	entstanden aus 500 nmol RNA

Tab. 13: Sequenzen der verwendeten Real-Time RT-PCR Systeme für die Zielgene Steroid-sulfatase und Sodium-dependent Organic Anion Transporter (Soat) sowie für das Referenzgen GAPDH (for = Vorwärtsprimer; rev = Rückwärtsprimer).

Gen:	Primer/Sonde	Produkt-größe	Accession-No.
Steroid Sulfatase	for: 5'-GCC TCC TGC TCG GCT TTC-3' rev: 5'-TGT CAC GGT TCC GCA TCA-3' Sonde: 5'-CAC TAC TTT CGG CCG CTC AAC TGC TTC-3'	65 bp	DQ_532016 (nt 903-968)
Soat	for: 5'-CTT TTC CAG ATG CTG AAT GGG TTT T-3' rev: 5'-CGT TTC CGT GTT TGT TCT TCA ATC T-3' Sonde: 5'-ATG GTT GCT GCA TAT AAG-3'	81 bp	EF_186076 (nt 883-964)
GAPDH	for: 5'-GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A-3' rev: 5'-TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC-3' Sonde: 5'-CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T-3'	82 bp	U85042 (nt 827-908)

Die verwendeten Primerpaare und Sonden hatten die in Tabelle 13 angegebenen Sequenzen. Die Sonden waren mit 6-FAM als Fluoreszenzfarbstoff markiert. Als Quencher wurde TAM-RA (Steroidsulfatase, GAPDH) bzw. MGB (Soat) verwendet. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Dazu wurden 23 µl des Reaktionsgemisches (s. Tabelle 12) in je ein Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Die Pipettierschritte fanden alle auf Eis statt. Als Negativkontrolle dienten 2 Ansätze, bei denen die RNA durch Wasser ersetzt worden war und dann, wie beschrieben, DNase-behandelt in die reverse Transkription eingesetzt worden war. Die 96 Well-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, das Reaktionsgemisch durch kurze Zentrifugation am Wellboden luftblasenfrei versammelt und die Platte in den Lightcycler eingesetzt. Zur Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

Tab. 14: Inkubationsprotokoll für die Real-Time RT-PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	40 Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min.	
Denaturierung	95°C	15 sek.	
Anlagerung und Elongation	60°C	1 min.	

Der Lightcycler zeichnet die Fluoreszenzintensität in jedem Well in jedem Zyklus auf. Das Programm legt selbstständig einen Intensitätsschwellenwert fest, auch Threshold genannt, ab dem die Intensität des Fluoreszenzsignals die Intensität der Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Dieser Wert sollte in einem Bereich liegen, in dem alle Proben einen exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals von einem zum nächsten Zyklus zeigen. Dieser Wert kann auch nachträglich manuell korrigiert werden. Die Zykluszahl, bei welcher in einem Well dieser festgelegte Schwellenwert überschritten worden ist, wird als C_T – Wert bezeichnet. Je höher die Konzentration des gemessenen Genfragmentes in dem Versuchsansatz und damit in der Ausgangs-mRNA war, umso früher wird dieser Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der C_T – Wert. Er ist damit umgekehrt proportional zum Logarithmus der in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des zu messenden Gens. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden zunächst für jede im Doppelansatz gemessene Probe der C_T – Mittelwert für das Housekeeping gene GAPDH (Referenzgen) von dem ermittelten C_T – Mittelwert für das Zielgen subtrahiert. Dieser Wert nennt sich ΔC_T :

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Als nächstes wurde der $\Delta\Delta C_T$ – Wert bestimmt. Dazu wurde die Probe mit der niedrigsten relativen Expression, also mit dem höchsten ΔC_T – Wert als Kalibrator verwendet, das heißt, dieser Wert wird von allen ΔC_T – Werten subtrahiert:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \text{Kalibrator}$$

Danach konnte die relative Genexpression (RGE), die die n-fache Expression des Zielgens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression angibt, errechnet werden:

$$RGE = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Zur Prüfung auf einen Einfluss der Beobachtungsgruppe auf die relative Genexpression wurde eine parametrische, einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Um einen Einfluss der Gewebeherkunft (fetal oder maternal) und des Trächtigkeitsstadiums zu analysieren, wurde zusätzlich bei der Untersuchung der Soat mRNA-Expression in Karunkel- und Kotyledonengewebe die Ergebnisse einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit gepaarten Stichpro-

ben unterzogen. Die statistischen Berechnungen wurden von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung unter Leitung von Dr. K.Failing erstellt.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen. Dazu wurde zunächst für ein 2%iges Gel 1,82 g Agarose in 91 ml TBE-Puffer bei 560 Watt in der Mikrowelle zweimal aufgekocht und so vollständig gelöst. Sobald die Lösung auf eine Temperatur von 60-80°C abgekühlt war, wurden 1,9 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung zugemischt und die Lösung in eine horizontale Gelelektrophoresegussform nach Kreutz gefüllt, der Spacer für die Geltaschen eingesetzt und das Gel auskühlen lassen. Es wurde dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt, 0,5 cm hoch mit TBE-Puffer überschichtet und der Spacer entfernt. 15 µl DNA-Lösung (z.B. PCR-Produkt, geschnittene Plasmid-DNA) wurden mit 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zur besseren Markierung und Beschwerung der Probe vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Zum späteren Größenvergleich wurden zusätzlich 1,5 µl einer Größenstandard-Lösung (100 bp GeneRuler™, 100 bp plus GeneRuler™ bzw. 1 kb GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 7 µl autoklaviertes Wasser und 1,5 µl Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Dann wurden die Proben ca. 40 min. lang bei 125 V und ca. 300 mA im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Detektion der entstandenen Banden erfolgte mittels Durchleuchtung mit UV-Licht (312 nm), welches das an die DNA gebundene Ethidiumbromid orange aufleuchten ließ. Die Gele wurden während der Durchleuchtung fotografiert und elektronisch gespeichert.

3.5 Extraktion von PCR-Produkten aus dem Agarosegel

Verwendet wurde das Qiaex II Gelextraktion Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Die betreffenden DNA-Banden wurden in dem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde das Gewicht der Gelstücke bestimmt. Die weitere Extraktion wurde gemäß dem Protokoll des Qiaex II Gelextraktion Kit-Herstellers durchgeführt.

3.6 Strategien zur Ermittlung unbekannter Gensequenzen

3.6.1 Bovine Steroidsulfatase

Zunächst wurde die bereits bekannte Sequenz der humanen Steroidsulfatase (Genbank, NM_00351) mit Rindergenomdaten mittels BLAST verglichen. Dabei wurden mehrere Fragmente im Rindergenom gefunden, die eine große Ähnlichkeit mit Teilen der humanen Steroidsulfatase-Sequenz hatten. Auf zwei dieser Fragmente wurde jeweils ein Primer des ersten Paares (Sts_1_for bzw. rev; s. Tab. 15) platziert. Durch die entsprechende RT-PCR entstand ein 803 bp PCR-Produkt, das gelelektrophoretisch aufgereinigt (siehe Kap. 3.4), aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert (siehe Kap. 3.5), in einen pGEM-T Vektor kloniert, in *E. coli* vermehrt, reisoliert (siehe Kap. 3.7) und sequenziert wurde. Das nächste Primerpaar (Sts_2_for bzw. rev) wurde so ausgewählt, dass der Vorwärtsprimer auf dem sequenzierten Fragment bindet, während der Rückwärtsprimer auf einem weiter Richtung 3' Ende der mRNA gelegenen Fragment bindet. Das so entstandene, 751 bp große Fragment wurde ebenfalls wie beschrieben kloniert und sequenziert. Es überlappte mit dem ersten Fragment und ließ sich mit ihm zusammenfügen. Um die noch fehlenden 3'- bzw. 5'-Enden zu erhalten, wurden RACE-PCR's verwendet. Der genspezifische Vorwärtsprimer (Sts_3-for) für die 3'-RACE PCR und der genspezifische Rückwärtsprimer (Sts_4_rev) für die 5'-RACE-PCR wurde jeweils so an den Enden der sequenzierten Fragmente platziert, dass sich jeweils ein überlappender Bereich zwischen RACE-PCR Produkt und dem bereits sequenzierten Fragment ergab. Auch diese Produkte wurden kloniert und sequenziert. Die verwendeten Schmelztemperaturen der angegebenen Primerpaare sind in Kap. 9.2 nachzulesen. Alle vier Fragmente wurden dann zusammengefügt, mit der humanen Sequenz und dem Rindergenom abgeglichen, der Open Reading Frame (ORF) gesucht (Programm SMS 2), die Exon-Intron-Grenzen anhand der humanen Genorganisation und der ag-/gt-Regel bestimmt, die Chromosomenzuordnung mittels Blast gegen das Rindergenom getroffen und der open reading frame in Protein übersetzt. Anschließend wurde mit einer weiteren RT-PCR der gesamte open reading frame amplifiziert, kloniert, sequenziert und in die Genbank eingetragen.

Tab. 15: Sequenzen der für die Klonierung der bovinen Steroidsulfatase (StS) verwendeten Primer und deren Position auf der bovinen Steroidsulfatase-Sequenz (DQ532016).

PCR Methode	Primer	Sequenz	Position
RT-PCR 1	Sts1_for	5'-CGTCCTGCTGATGGCTGACG-3'	(nt 306-325)
	Sts1_rev	5'-TCGAAGAGAAGAGAGCCGTG-3'	(nt 1089-1108)
RT-PCR 2	Sts2_for	5'-ACGACAACCTCACGCAGAG-3'	(nt 989-1007)
	Sts2_rev	5'-GGAAATCTCAAACAGCAGGG-3'	(nt 1718-1737)
3' RACE-PCR	Sts_3_for	5'-TGGCACCCACCCAACAGCACG-3'	(nt 1582-1602)
5' RACE-PCR	Sts_4_rev	5'-GTCGATATTGGGAGTCCTGAGT-3'	(nt 367-387)
ORF	Sts_exp_for	5'-GACATGATGACCCTTCTGCTTC-3'	(nt 232-253)
	Sts_exp_mitStop_rev	5'-GTAACGGCTAAGGGCTGTGTC-3'	(nt 1958-1978)

3.6.2 Boviner Soat und seine Varianten

Vom bovinen Soat existierte zu Beginn der eigenen Arbeiten bereits eine 1134 bp umfassende Predicted Sequence (XM_613388) und ein 354 bp großes Fragment (DQ_409211) in der Genbank, sowie die humane Sequenz (EF_437223). Zunächst wurden diese Sequenzen miteinander sowie mit dem Rindengenom verglichen. Als Strategie zur Ermittlung des Open Reading Frames (ORF) wurde das sogenannte „Primer Walking“ verwendet, das sich überlappende PCR-Produkte produziert. Die mit dem ersten Primerpaar (bovSOAT1; s. Tab. 16) erhaltenen PCR-Produkte wurden im Gel aufgereinigt (Kap. 3.4), ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert (Kap. 3.5) und sequenziert. Das zweite Primerpaar wurde so gewählt, dass das neu entstehende PCR-Produkt mit dem Produkt des ersten Primerpaares überlappt und dieses erweitert. Zur Erfassung des 3'- und 5'-Endes des open reading frames wurden mit Hilfe der Rindengenomdaten die an den open reading frame anschließenden, möglichen UTR-Bereiche herausgesucht. Für das 5'-Ende wurde der Vorwärtsprimer (bov SOAT3_for) auf der 5'-UTR platziert und der Rückwärtsprimer (bov SOAT3_rev) auf dem bereits sequenzierten Mittelstück der Sequenz. Für das 3'-Ende war das Vorgehen genau umgekehrt (Primerpaar Bov-SOAT4; Vorwärtsprimer auf dem Mittelstück, Rückwärtsprimer auf der 3'-UTR). Anschließend wurde noch ein Primerpaar (s. Tab. 17) eingesetzt, das Start- und Stopcodon einschloss, um die Kompletsequenz zu erhalten. Alle verwendeten Schmelztemperaturen der Primerpaare sind in Kap.9.2 zu finden.

Während der Arbeiten zur Klonierung des bovinen Soats traten mehrere Varianten auf. Anhand der Größenunterschiede der entsprechenden PCR-Produkte wurden diese im Gel ge-

trennt (Kap 3.4), ausgeschnitten, extrahiert (Kap 3.5), kloniert (Kap 3.7) und vollständig sequenziert. Mit Primerpaaren, die gezielt das Vorhandensein von Deletion (bovSOAT1), Insertion (bovSOAT5), sowie Insertion plus Deletion (bovSOAT6) anzeigen, wurde dann ein Screening des Probenmaterials aus den Rinderplazenten durchgeführt (s. Tabelle 16 und Abb. 7). Auch hier wurden stichprobenartig einige Banden ausgewählt, aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert (Kap 3.5), kloniert (Kap 3.7) und vollständig sequenziert.

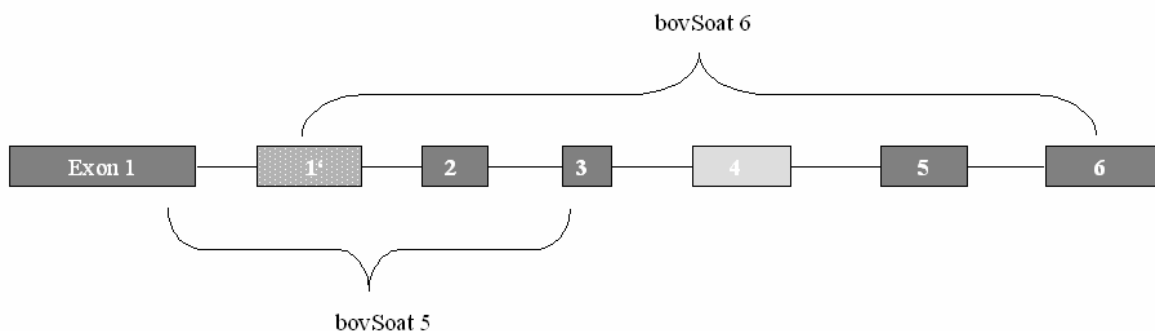


Abb. 7: Position der Primerpaare bovSOAT5 und 6 auf der bovinen Soat-mRNA. Primerpaar bovSOAT5 zeigt eine Bande mit 192 bp, wenn kein Exon 1' vorhanden ist und eine Bande mit 389 bp wenn Exon 1' vorhanden ist. Primerpaar BovSOAT6 zeigt nur Banden, wenn Exon 1' vorkommt. Die Bande ist 817 bp groß, wenn Exon 4 vorhanden ist und 620 bp groß, wenn eine Deletion von Exon 4 vorliegt.

Tab. 16: Die für die Klonierung des bovinen Soats verwendeten Primersequenzen und ihre Position in Variante 1 (V1: EF186076), bzw. Variante 4 (V4: EF 495206). GP bezeichnet die Sequenz BC149199 aus dem Rindergenomprojekt. Hier sind auch die den open reading frame der Soatvarianten flankierenden Primer auf der 5' bzw 3'-UTR zu finden. Die verwendeten Schmelztemperaturen sind in Kap. 9.2 zu finden.

PCR Methode	Primer	Sequenz	Position in Variante 1 bzw. 4, GP
RT-PCR 1	bovSOAT1_for	5'-GCCACTCTGCCTTTATCTCTAC-3'	V1 (nt 423-444)
	bovSOAT1_rev	5'-CTTCTTGACAACCTGGGCTTCTC-3'	V1 (nt 964-985)
RT-PCR 2	bovSOAT2_for	5'-GAACCTGGACCTCGTATTACAG-3'	V1 (nt 84-106)
	bovSOAT2_rev	5'-AGAGTGGCTTCTTCATTCACCTC-3'	V1 (nt 1036-1058)
RT-PCR 3	bovSOAT3_for	5'-TTGTGATGCTGCCTTATGGAG-3'	GP (nt 31-51)
	bovSOAT3_rev	5'-CATTGTGGAACAGGTTGTCATAC-3'	V1 (nt 383-405)
RT-PCR 4	bovSOAT4_for	5'-GGCTTTCTCCTGGCACTTCTTACC-3'	V1 (nt 721-744)
	bovSOAT4_rev	5'-GGTGTAGTCAAACCAACAAGCC-3'	GP (nt 1195-1216)
RT-PCR 5	bovSOAT5_for	5'-CAGGGGGAACGTCTCAAAC-3'	V1 (nt 320-339)
	bovSOAT5_rev	5'-AGGCACACAAGGGTGATTC-3'	V1 (nt 497-515)
RT-PCR 6	bovSOAT6_for	5'-CAGAGACCCTGAAAATAGGAC-3'	V4 (nt 466-486)
	bovSOAT6_rev	5'-AGGACTTAGAGTGGCTTCTTC-3'	V1 (nt 1045-1064)

Die Bestimmung des open reading frames, der Exon-Intron-Grenzen, der Chromosomenzuordnung und die Vorhersage der Aminosäuresequenz erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.6.1 für die bovine Steroidsulfatase beschriebenen Verfahren.

Zur Vorhersage der Transmembrandomänen des Soats wurde zunächst die betreffende Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und diese dann mit den Softwareprogrammen TMAP, TMHMM Server v. 2.0, TMPred, Sosui, TopPred2 Kyte-Doolittle-Scale und Goldman-Engelman-Seitz-Scale, sowie zur Vorhersage möglicher Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen mit NetNGlyc und NetPhos bearbeitet. Das bevorzugte Vorhersagemodell wurde durch die Analyse des Alignments der vorhergesagten, bovinen Aminosäuresequenz mit der humanen Soat-Aminosäuresequenz, sowie dem Vergleich mit den Erkenntnissen beim humanen Soat-Protein zur Lage des N- und

C-Terminus und der möglichen Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen (Geyer et al. 2007) entwickelt.

3.7 Klonierung von PCR-Produkten

Verwendet wurde der pGEM-T[®] bzw. der pGEM-T easy Vektor von Promega. Bei diesen Vektoren handelt es sich um bereits geöffnete Plasmide mit Restriktionsschnittstellen, kodierter Ampicillin-Resistenz, einem lacZ-Gen und einem T-Überhang an der Öffnungsstelle. Die Öffnungsstelle liegt im lac-Z Gen, so dass eine Blau-Weiß-Selektion auf Bakterienkolonien mit integriertem PCR-Produkt im Vektor möglich ist. Diese Blau-Weiß-Selektion funktioniert wie folgt: Schließt sich der Vektor, ohne ein PCR-Produkt als Insert zu integrieren, so ist das lac-Z Gen wieder intakt. Isopropylthiogalactosid (IPTG) aktiviert das Operon und induziert die Ablesung des lac-Z Gen und die Bildung von β -Galactosidase. Die β -Galactosidase bildet aus dem künstlichen Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid) das 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl, das mit dem Luftsauerstoff weiter zum blauen 5,5-Dibrom-4,4-Dichlorindigo reagiert. Wurde jedoch an der Öffnungsstelle des Vektors das PCR-Produkt eingefügt (ligiert), ist die Gensequenz für die β -Galactosidase unterbrochen und es kann kein funktionstüchtiges Enzym gebildet werden. Die chemische Umsetzung des X-Gal unterbleibt und die Bakterienkolonien zeigen ihre übliche weißliche Färbung.

Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde zunächst der Ligationsansatz, bestehend aus 4 μ l Ligationspuffer, 4 μ l aus dem Agarosegel extrahiertes PCR-Produkt (Kap. 3.5), 1 μ l Vektor und 1 μ l Ligase mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die A-Überhänge des PCR-Produkts interagieren dabei mit den T-Überhängen an der Öffnungsstelle des Vektors. Daher wird diese Art der Klonierung als T/A-Klonierung bezeichnet. Die ligierten Plasmide wurden anschließend in speziell präparierte (kompetente) E. coli namens XL-1 blue eingeschleust (Transformation). Dazu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. 100 μ l Bakterienlösung wurden mit 1,7 μ l β -Mercaptoethanol in einem 2 ml Reaktionsgefäß versetzt und vorsichtig 10 min. lang alle 2 min. durchmischt. Anschließend wurde der Ligationsansatz hinzugefügt, vorsichtig gemischt und die Bakterien 30 min. auf Eis ruhen gelassen. Der folgende „Heat Shock“ von 42°C für 45 Sekunden soll die Transformationseffizienz erhöhen. Nach 2-minütiger Abkühlung auf Eis wurden den Ansätzen 900 μ l 37°C warmes LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien bei 37°C 60 min. lang im Wärmeschüttler inkubiert. In dieser Zeit wurden Nährböden, bestehend aus LB-Agar-Medium, Ampicillin, IPTG (40 μ l; Konzentration der Stammlösung: 200 mg/ml) und X-Gal (40 μ l; Konzentration der Stammlösung:

20 mg/ml) vorbereitet. 300 µl der Bakterienlösung wurden unter möglichst sterilen Bedingungen auf einem Nährboden verteilt und die Platten mit den Bakterien über Nacht bei 37°C bebrütet. Nur Bakterien, die das Plasmid mit Ampicillin-Resistenz-Gen aufgenommen haben, können überleben und sich vermehren. Das Herunterkühlen der Platten auf 4°C für 1-2 Stunden intensiviert die blaue Farbausprägung der Bakterienkolonien ohne integriertem PCR-Produkt (negativ) im Plasmid. Je eine weiße (positive) Bakterienkolonie wurde in 4 ml angewärmtes LB-Medium mit Ampicillin überführt und für ca. 16 Stunden bei 37°C und 220 U/min pro Minute im Wärmeschüttler vermehrt. Nach dieser Vermehrung wurden 850 µl Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zur erneuten Anzucht konserviert.

Aus 2 ml der Bakterienkultur wurden unter Verwendung des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) die Plasmide nach dem Protokoll des Herstellers (QIAprep Spin Miniprep Kit Mikrozentrifuge Protokoll) isoliert und die DNA-Konzentration der Präparation photometrisch bestimmt. Zur zusätzlichen Kontrolle auf die Anwesenheit des PCR-Produkts im Vektor wurde ein Kontrollverdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Beim pGEM-T Vektor kann unter Verwendung der Restriktionsenzyme NOT I und NCO das Insert aus dem Vektor entfernt werden. Dazu wurden 5 µl gewonnene Plasmid-DNA mit 1 µl NCO-Puffer, 1 µl NOT I-Puffer, 2 µl BSA-Lösung, 1 µl NCO, 1 µl NOT I und 10 µl autoklaviertes Wasser in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für den pGEM-T easy Vektor wurden 5 µl gewonnene Plasmid-DNA mit 1 µl NOT I Puffer, 2 µl BSA-Lösung, 1 µl NOT I und 12 µl autoklaviertes Wasser einpipettiert. Die Reaktionsansätze wurden jeweils für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese auf das Vorhandensein einer Bande mit ungefährender Größe des ursprünglichen PCR-Produkts geprüft. Die Versuche wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen mit Unterstützung von B. Döring und unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Geyer durchgeführt. Die Sequenzierung der Plasmide mit Insert wurde von der Firma SRD Scientific Research and Development GmbH, Oberursel durchgeführt.

3.8 Proteinexpression

3.8.1 Klonierung in den Expressionsvektor

Als Insert für den Expressionsvektor wurde ein aus dem Agarosegel aufgereinigtes PCR-Produkt verwendet. Das Insert bestand aus der gesamten Sequenz des open reading frames

einschließlich Start- und Stopcodon (Tab. 17, verwendete Schmelztemperaturen siehe Kap. 9.2).

Tab. 17: Sequenzen des Primerpaars zur Amplifikation des Soat-ORF einschließlich Stopcodon

	Primernamen	Sequenz
Soat mit Stop	Soat_anfg_for	5'-GGAGATAAGGAGATGAGAGCAA-3'
	Soat_MS_rev	5'-ACAAGCCCCTACTTGGCACG-3'
StS mit Stop	Sts_exp_for	5'-GACATGATGACCCTTCTGCTTC-3'
	Sts_exp_mitStop_rev	5'-GTAACGGCTAAGGGCTGTGTC-3'

Ziel war es fehlerfreie Proteine, basierend auf den zuvor erarbeiteten und in Genbank eingetragenen, vollständigen mRNA-Sequenzen der Steroidsulfatase (StS) und Soat Variante 1 zu erhalten. Dazu wurde ein Plasmid als cDNA-Matrize verwendet, das bei der Sequenzierung keine Mutation mit Aminosäureaustausch gezeigt hatte. Als Expressionsvektor wurde pcDNA5/FRT (Invitrogen, Karlsruhe) gewählt. Für die Ligation wurden der pcDNA5/FRT-Vektor und aufgereinigtes PCR-Produkt oder Insert aus dem pGEM-T easy Vektor im Verhältnis 1:3 mit 4 µl Ligationspuffer und 1 µl Ligase vermischt, so dass ein Volumen von 10 µl entstand. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die nachfolgende Transformation, Anzucht auf Platten, Anzucht in der Übernachtschüttelkultur, Anlegen eines Glycerinaliquots, Rückgewinnung der Plasmide aus der Bakterienkultur erfolgte wie in Kapitel Abschnitt 3.7 beschrieben, allerdings ohne Blau-Weiß-Selektion, da diese bei dem hier verwendeten Plasmid nicht möglich war. Für den Kontrollverdau wurden Restriktionsenzyme verwendet, die im Insert und im Vektor schneiden. Anhand der Größe des herausgeschnittenen Fragmentes und des Vektorrestes ließ sich die Einbaurichtung des Inserts in dem Vektor erkennen ($5' \rightarrow 3'$ oder $3' \rightarrow 5'$), sowie ob überhaupt ein Insert vorhanden war. Für die Sequenzierung wurden nur solche Klone ausgewählt, bei denen das Insert in $5' \rightarrow 3'$ Richtung eingebaut war. Nach der Identifizierung von „fehlerfreien“ Klonen (keine Mutationen die zum Aminosäureaustausch führen und mit $5' \rightarrow 3'$ -Orientierung im Vektor) wurden die entsprechende Glycerinaliquots vorsichtig aufgetaut und die enthaltenen transgenen Bakterien in 50 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz in einer Übernachtschüttelkultur vermehrt. Am nächsten Tag wurde von der Kultur erneut ein Glycerinaliquot angelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Aus der restlichen Bakterienkultur wurden die Plasmide extrahiert. Dazu wurde das Pure Yield Midi Kit (Promega, Mannheim) ent-

sprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Es wurde die DNA-Konzentration der gewonnenen Plasmid-Präparation photometrisch bestimmt und das Plasmid bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Versuche wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Geyer durchgeführt.

3.8.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Es wurden $2,8 \times 10^6$ HEK293 Zellen in einer 25 cm² Flasche oder einer 12 Well-Platte ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ in MSR-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin, Streptomycin und Geneticin kultiviert. Wenn der Zellrasen 70-80% der Kulturfläche bedeckte, waren die Zellen bereit zum Einsatz in der transienten Transfektion.

Für die transiente Transfektion wurde die Liposomen-vermittelte Methode des Roti[®]-Fect Systems (Roth GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 12 µg Expressionsplasmid-DNA mit 363 µl MSR-Medium ohne FKS und ohne Antibiotikazusatz vermischt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit DNA eines Expressionsplasmid ohne Insert vorbereitet. Dann wurden 62,5 µl Roti[®]-Fect-Reagenz mit 687 µl MSR-Medium ohne Zusätze versetzt und je 375 µl davon mit Plasmid-DNA-Verdünnung (mit bzw. ohne Insert) vermischt. Zur Ausbildung der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe wurden die Gemische 30 min. bei Raumtemperatur (RT) ruhen gelassen. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und mit MSR-Medium mit 10% FKS ohne Antibiotikazusatz überschichtet. Dann wurden die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe der Zellkultur hinzugefügt und die Zellen ca. 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Auf die Transfektionsphase folgte ein kompletter Mediumwechsel mit Waschen der Zellen mit PBS. Das neue Medium bestand aus MSR-Medium mit FKS und Antibiotikazusatz sowie 10 mM Natriumbutyrat zur Verbesserung der Expression. Mit diesem Medium wurden die Zellen erneut ca. 20-24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Damit war die transiente Transfektion und Proteinexpression abgeschlossen. Je nach Versuch wurden die Zellen dann in den Transportversuch übernommen (Soat) oder vom Untergrund abgelöst und aliquotiert (Steroidsulfatase). Die Versuche wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen mit Unterstützung von B. Döring unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Geyer durchgeführt.

3.8.3 Untersuchung der Steroidsulfatase-transfizierten Zellen auf Steroidsulfataseaktivität durch Inkubation mit verschiedenen Steroidsulfaten

Dazu wurden HEK293-Zellen in 25 cm²-Flaschen angezüchtet und wie in Abschnitt 3.9 beschrieben transient mit der bovinen Steroidsulfatase transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem Expressionsvektor ohne Insert scheintransfiziert worden waren. Zum Ablösen der Zellen vom Untergrund wurde zunächst das Medium vollständig entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen 5 min. lang bei 37°C mit Versene-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und durch eine Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt. Die Kulturen wurden so lange bei 37°C inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Dann wurde der Trypsin-Verdau durch die Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension weiter mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Anschließend wurde mittels Trypanblaufärbung (400 µl PBS + 50 µl Zellsuspension + 50 µl Trypanblau-Lösung) im Zählkammerverfahren die Gesamtzellzahl sowie der Prozentsatz toter Zellen bestimmt. Tote Zellen erscheinen bei diesem Verfahren als blau gefärbt, lebende Zellen sind farblos. Die Zellen wurden in Portionen zu 1,5 Mio. lebende Zellen in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aliquotiert und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

Die Inkubationsversuche für den Nachweis der Steroidsulfatase-Aktivität der transfizierten Zellen und zur Charakterisierung der Substratspezifität beinhalteten vier parallele Ansätze: **1)** Steroidsulfatase-transfizierte Zellen **2)** Steroidsulfatase–transfizierte, hitzeinaktivierte Zellen **3)** scheintransfizierte Zellen ohne Hitzeinaktivierung **4)** scheintransfizierte Zellen mit Hitzeinaktivierung. Jeder Ansatz enthielt 1,5 Mio. Zellen in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung. Die Zellen wurden aufgetaut, in 15 ml Reagenzgläser überführt, mit je 3,33 µl 30%ige BSA-Lösung versetzt und im Ultraschallbad lysiert (3x 5sek.). Für die Hitzeinaktivierung wurden die entsprechenden Zellpräparationen 20 min. im Wasserbad gekocht. Danach wurden ihnen, wie den anderen Zelllysaten, das jeweilige Substrat – 3,67pmol ³H-Estronsulfat bzw. 1,07 pmol ³H-Pregnenolonsulfat in je 100µl BSA-Puffer - zugegeben. Danach wurden die Ansätze 30 min. lang bei 37°C im Wasserschüttelbad inkubiert. Anschließend wurde in allen Ansätzen die Reaktion durch 20 minütiges Kochen im Wasserbad gestoppt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei –20°C aufbewahrt.

Zur Messung der Substratumwandlung wurde zunächst das freie Steroid aus den Proben extrahiert. Dazu wurden die Proben mit 3,5 ml Toluol versetzt, 15 min. bei Raumtemperatur über Kopf rotiert und dann zur besseren Trennung von wässriger und organischer Phase bei 2000 g kurz anzentrifugiert. Durch das Einsetzen der Proben in ein Trockeneis-Ethylalkoholbad gefror die wässrige Phase, so dass sich die weiterhin flüssige Toluolphase mit dem freien Ste-

roid leicht in ein neues Reagenzglas dekantieren ließ. Dieser Extraktionsvorgang wurde zweimal wiederholt und die Extrakte gepoolt (Fraktion der freien Steroide). Der verbleibenden wässrigen Phase wurden je 320 µl Hydrolysepuffer (pH 4,8), sowie 60 µl Glucuronidase-Arylsulfatase aus *Helix pomatia* hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann gründlich gevortext und bei 37°C im Wärmeschüttelbad über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das durch Hydrolyse aus den in den Versuchsansätzen verbliebenen konjugierten Steroiden freigesetzte freie Steroid wie oben beschrieben dreimal mit Toluol extrahiert (Fraktion der konjugierten Steroide). Die Extrakte der freien bzw. konjugierten Steroidfraktion wurden durch Verdampfen des Toluols bei 50°C im Evaporator niedertrocknet und in Szintillationsflüssigkeit rückgelöst. Anschließend erfolgte im β -Counter die Messung der ^3H -Zerfälle. Zu Kontrollzwecken wurde die in den Reaktionsgefäßen in der wässrigen Phase verbliebene ^3H -Aktivität ebenfalls gemessen. Aus der in der Fraktion der freien Steroide gemessenen ^3H -Aktivität und der insgesamt in die Versuchsansätze eingebrachten ^3H -Aktivität wurden die prozentualen Hydrolyseraten berechnet (Hoffmann et al. 1997, 2001).

3.8.4 Transportmessungen an transfizierten HEK293-Zellen zur Charakterisierung der Substratspezifität des bovinen Soat

Die Zellen wurden in 12 Well-Platten angezüchtet und transfiziert (s. Kap.3.8.2). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem Expressionsplasmid ohne Insert scheintransfiziert wurden. Zu Beginn der Transportmessung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Adaptationsphase von 5 min. an den 142,9 mM NaCl enthaltenden Transportpuffer. Dann wurde der Transportpuffer durch Transportpuffer mit 2,5 µM tritiummarkierten Steroidsulfaten (Estronsulfat, Pregnenolonsulfat bzw. DHEA-Sulfat) ersetzt und die Versuchsansätze 30 min. bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde noch die Natriumabhängigkeit der Steroidsulfataufnahme geprüft, indem Transportpuffer mit 142,9 mM Natriumchlorid bzw. ohne Natrium (Natriumchlorid wurde gegen equimolar konzentriertes Cholinchlorid ausgetauscht) verwendet wurde. Nach der Inkubation wurde der Transportpuffer sorgfältig entfernt und die Zellen fünfmal in kaltem PBS gewaschen, um anhaftende ^3H -Steroidsulfate zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit 1 N Natronlauge/0,1% SDS lysiert und mit Scintillatorlösung versetzt. Die zur Menge des aufgenommenen ^3H -Steroidsulfates proportionale ^3H -Aktivität des Zelllysates wurde im β -Counter gemessen und in die aufgenommene Stoffmenge umgerechnet. Zusätzlich wurde noch die Proteinmenge der einzelnen Ansätze bestimmt und mit der aufgenommenen Steroidsulfatmenge in Relation gesetzt.

3.9 Immunhistologische Darstellung der Steroidsulfatase in Paraffinschnitten von Rinderplazentomen

Verwendet wurde ein Antiserum, das durch Immunisierung von Kaninchen mit humaner Steroidsulfatase erzeugt (Dibbelt und Kuss 1986; Dibbelt et al. 1989) und von Herrn Dr. Bernhard Ugele, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, I. Frauenklinik Innenstadt zur Verfügung gestellt wurde. Die Kreuzreaktivität des Antiserums mit der bovinen Steroidsulfatase wurde im Western Blot von der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Ugele bestätigt (siehe Anhang).

Für die Immunhistologie wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf Superfrost®-Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte für zweimal 4 min. in Xylol getaucht und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2x4 min. Xylol, 2x2 min. Ethanol 100%, 2x2 min. Ethanol 95%, 2x2 min. Ethanol 70%, 5 min. unter fließendem Wasser). Die Schnitte wurden dann 5 min. in kaltem 10 mM Citratpuffer pH 6.0 vorsichtig geschüttelt, in heißem Citratpuffer 3x5 min. bei 560 Watt in der Mikrowelle gekocht und dann 20 min. bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Das Kochen im Citratpuffer diente dem Freilegen eventuell maskierter Epitope. Nach einem Waschschrift (5 min. unter fließendem Wasser) wurde das Gewebe zur Inaktivierung endogener Peroxidasen 30 min. in einer frisch hergestellten methanolischen, 0,3%-igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und dann erneut gewaschen (5 min. in ICC Puffer pH 7.2 auf dem Schüttler). Es folgte der Serumblock zur Reduktion unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an das Gewebe. Dazu wurde Serum der gleichen Herkunftsspezies wie der Sekundärantikörper, in diesen Fall Ziegenserum, 1:10 mit ICC-Puffer verdünnt und 20 min. bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Um ein Ablaufen des Serums vom Schnitt zu verhindern wurde zuvor eine Flüssigkeitsbarriere mittels Pap-Pen um die Schnitte gelegt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Blockierungslösung abgesaugt, der 1:2000 mit ICC-Puffer verdünnte Erstantikörper aufgetragen und die Schnitte bei 4°C für ca. 20 Stunden über Nacht inkubiert. In den Negativkontrollen wurde der spezifische Primärantikörper durch das entsprechend verdünnte Serum eines nicht-immunisierten Kaninchens ersetzt. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper von den Schnitten abgeklopft und die Schnitte gewaschen (5 min. in ICC-Puffer auf dem Schüttler). Anschließend wurden die Pap-Penbarriere abgetrocknet, der Sekundärantikörper (biotinylierte Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG, Verdünnung 1:200 in ICC-Puffer) aufgetragen und die Schnitte 30 min. bei Raumtemperatur in der

feuchten Kammer inkubiert. Darauf folgten ein erneuter Waschschrift (5 min. in ICC-Puffer auf dem Schüttler), Abtrocknen der Barriere und Aufbringen des Avidin-Biotin-Peroxidase-Systems für weitere 30 min., ein weiterer Waschschrift im ICC-Puffer, Trocknen der Barriere und eine 7 minütige Inkubation mit der Substratlösung (Nova Red[®]). Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte 5 min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte optional durch ein kurzes Tauchbad in einer Hematoxylin-Lösung, gefolgt von erneutem Spülen unter fließendem Wasser. Dann wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 min. Ethanol 96 %, 2x2 min. Ethanol 100%, 2x3 min. Xylol) dehydriert und mit Histokit die Deckgläser aufgeklebt. Nach Aushärten des Histokit fand die Auswertung der Präparate am Mikroskop statt.

Ausgewertet wurden zwei Schnitte pro Plazentom eines Tieres. Berücksichtigt wurde das Farbsignal in verschiedenen Zelltypen und deren Lokalisation im Plazentom. Dazu wurde das Plazentom nach funktionellen Gesichtspunkten in verschiedene Regionen eingeteilt (Abb. 8.) Zur Beurteilung der Färbeintensität der Zellen wurden mittels Fotos Standards für kein, ein schwaches, ein mittleres und ein starkes Steroidsulfatase-Signal definiert. Die Auswertung wurde durch Vergleich der Färbeintensitäten an den ausgewählten Lokalisationen mit den definierten Standards vorgenommen. Die Beurteilung der Schnitte wurde von einer einzigen Person, in zufälliger Reihenfolge und ohne Kenntnisse der Probenherkunft durchgeführt.

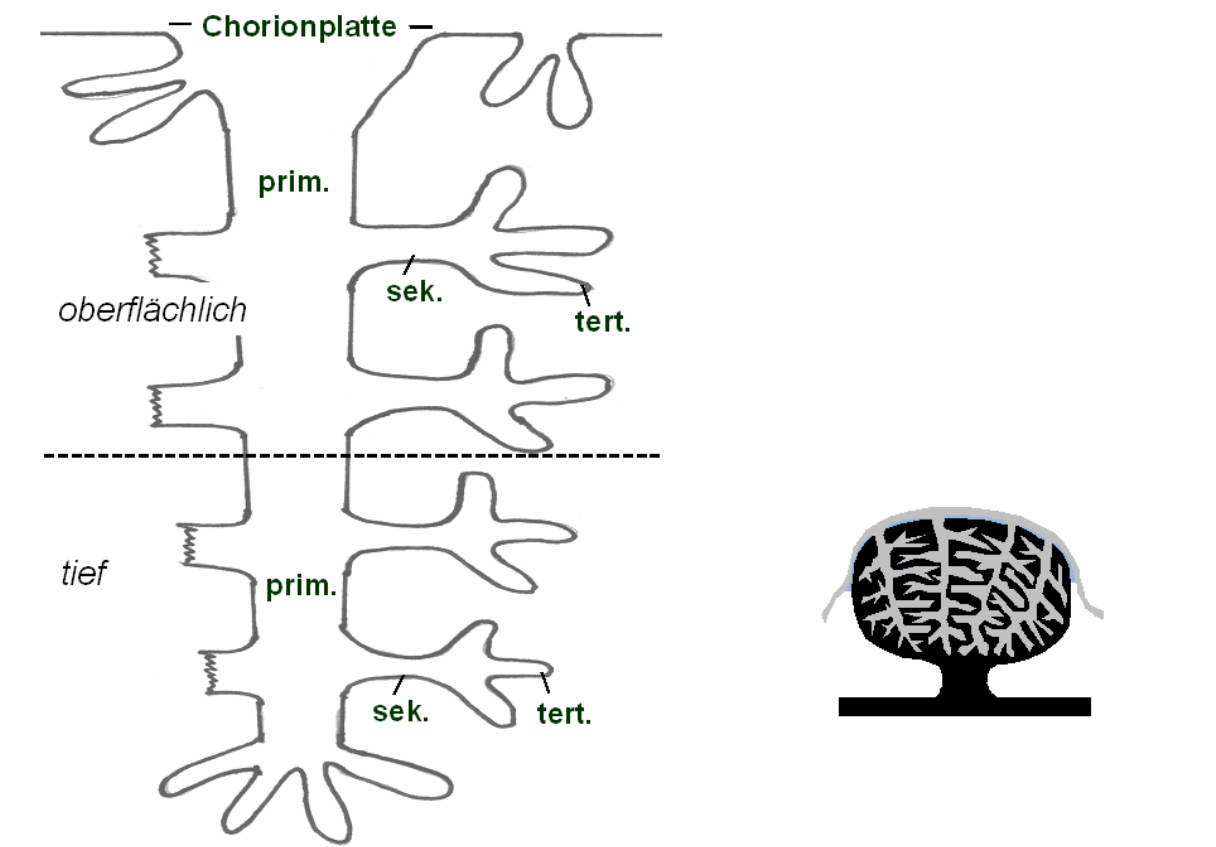


Abb. 8: Schematische Darstellung des Plazentoms und des Zottenbaumes mit Einteilung der bei der Auswertung der Immunfärbung erfassten Regionen.

prim./sek./tert. = primäre, sekundäre bzw. tertiäre Chorionzotten

3.10 Verwendete Lösungen, Medien und Puffer

3.10.1 Gelelektrophorese

0,5 M EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

EDTA 37,22 g

Aqua dest. ad 200 ml

auf pH 8,0 einstellen mit NaOH (Lösungs-pH für EDTA)

TBE (10x) Puffer pH 8,8

Tris 108 g

Borsäure 55 g

0,5 M EDTA (pH 8,0) 40 ml

Aqua dest. ad 1000 ml

TBE (1x) Puffer

TBE (10x) Puffer	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

3.10.2 KlonierungLB-Medium mit Ampicillin

Kapseln LB Medium	25 Stk.
Aqua bidest.	ad 1000 ml
Autoklavieren, abkühlen lassen	
Ampicillin (1 µg/µl)	1000 µl

LB-Agar Medium mit Ampicillin

Kapseln LB-Medium mit Agar	40 Stk.
Aqua bidest:	ad 1000 ml
Autoklavieren, abkühlen lassen auf ca. 60°C	
Ampicillin (1 µg/µl)	1000 µl
Kulturschalen steril befüllen	

Glycerinkulturen

Glycerin (autoklaviert)	150 µl
Übernacht-Bakterienkultur	850 µl
schockfrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei –80°C	

3.10.3 ProteinexpressionBSA-Puffer (pH 7,2)

KH ₂ PO ₄	2,69 g
Na ₂ PO ₄	8,39 g
NaN ₃	0,325 g
BSA	1 g
Aqua dest.	ad 1 l

H³-Estronsulfatlösung für den Steroidsulfatase-Aktivitätsnachweis

H ³ -Estronsulfat	3,67 pmol
BSA-Puffer	ad 100µl

H³-Pregnenolonsulfatlösung für den Steroidsulfatase-Aktivitätsnachweis

H ³ -Pregnenolonsulfat	1,05 pmol
BSA-Puffer	ad 100µl

2,5 µM H³-Steroidsulfatlösung mit Natriumchlorid für die Transportmessung pH 7,4

H³-Pregnenolonsulfat, H³-Estronsulfat bzw. H³-Dehydroepiandrosteronsulfat ad 2,5µM

NaCl	8,35 g
KH ₂ PO ₄	0,21 g
CaCl ₂	0,2 g
MgSO ₄	0,144 g
HEPES	4,766 g
Aqua dest.	ad 1l

2,5 µM H³-Steroidsulfatlösung, natriumfrei für die Transportmessung pH 7,4

H³-Pregnenolonsulfat, H³-Estronsulfat oder H³-Dehydroepiandrosteronsulfat ad 2,5µM

C ₅ H ₁₄ NOCl (Cholinchlorid)	19,95g
KH ₂ PO ₄	0,21 g
CaCl ₂	0,2 g
MgSO ₄	0,144 g
HEPES	4,766 g
Aqua dest.	ad 1l

Hydrolysepuffer pH 4,8

1 N NaOH	300 ml
1 N Essigsäure	500 ml

3.10.4 Gewebefixierung und Immunhistochemie

Formaldehyd 4%ig, gepuffert, pH 7,4 (Formol nach Lillie)

wässrige Formaldehydlösung (40%ig)	500 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 g
Na_2HPO_4	32,5 g
Aqua dest.	ad 5000 ml

Phosphatpuffer zur Aufbewahrung der fixierten Gewebeproben

Lösung A:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Lösung B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Lösung A	14,15 ml
Lösung B	35,85 ml

Alkoholreihe

Ethanol (96%)

Ethanol reinst (100%)	96 ml
Aqua dest.	4 ml

Ethanol (70%)

Ethanol reinst (100%)	70 ml
Aqua dest.	30 ml

Ethanol (50%)

Ethanol reinst (100%)	50 ml
Aqua dest.	50 ml

Ethanol (30%)

Ethanol reinst (100%) 30 ml

Aqua dest. 70 ml

10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für die Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure

$C_6H_8O_7 \times H_2O$ 21,0 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ 29,41 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A 9 ml

Stammlösung B 41 ml

Aqua dest. 450 ml

Methanolische H_2O_2 -Lösung 0,3%ig

H_2O_2 30%ig 2 ml

Methanol reinst ad 200 ml

ICC-Puffer pH 7,2 – 7,4

Na_2HPO_4 1,2 g

KH_2PO_4 0,2 g

KCl 0,2 g

NaCl 8,0 g

Aqua dest. ad 1000 ml

pH 7,2 – 7,4 einstellen und anschließend 3 ml Triton X-100 zugeben

3.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

ABC-Kit: Vector Standard Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

ACS:180 Kit – Progesterone (Bayer Health Care, Fernwald)

Agarose, ultra pure, electrophoresis grade (GibcoBRL, Life Technologies, Kalsruhe)
Ampicillin-Natriumsalz 100 µg/µl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
Aquasafe 300 Szintillatorlösung (Zinsser, Frankfurt/Main)
Arylsulfatase-Glucuronidase aus *Helix pomatia* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Borsäure, Pufferan® (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
Bovine Serumalbuminlösung 30%, Zellkultur geeignet (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
Chloroform (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
DHEA-Sulfat, tritiummarkiert, 60 Ci/mmol (PerkinElmer Life Science Inc., Boston, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat, reinst (Merck KGaG, Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaG, Darmstadt)
DNase I, RNase frei, 10 U/µl (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
DNA-Ladder 100 bp, (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
DNA-Ladder 100 bp plus, (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
DNA-Ladder 1 kb, (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
E.coli, XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
EDTA-Dinatrium-Dihydrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
6,7 ³H(N) Estron-3-sulfat, Amoniumsalz, 57 Ci/mmol (PerkinElmer Life Science Inc., Boston, USA)
Ethanol 99,6%, DAB 10 (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Ethidiumbromidlösung 1% (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
F12 Nutrient mixture (Ham) mit Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
Formaldehydlösung 37% (Merck, KGaA, Darmstadt)
Gene Amp RNA Core Kit® (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt)
Glycerin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
HEK293 Zelllinie (Invitrogen, Karlsruhe)
Hematoxilin (Merck, KGaA, Darmstadt)
Histokit (Assistent, Osterode)
Isopropanol (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Kaliumchlorid (Merck, KGaA, Darmstadt)
Kaliumphosphat monobasisch, (Fluka, Neu-Ulm)
Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
Kohlendioxid (Balser GmbH, Giessen)

LB-Medium (Bio 101 Inc. CA, USA)
LB-Medium-Agar (Bio 101 Inc. CA, USA)
Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
Mikrotomklingen Leica DB 80L (Leica Mikrosystems GmbH, Nußloch)
Natronlauge 1 N (Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumhydroxid (Merck KGaA, Darmstadt)
NCO I Restriktionsendonuklease mit Puffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main)
NOT I Restriktionsendonuklease mit Puffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main)
NovaRed Substrat Kit (Vector Laboratories Burlingame, USA)
Pap-Pen (G. Kisker Biotech, Steinfurt)
Papiertücher Kimwipes (Ladd Industries, Williston)
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml ultradünn, RNase-/DNase-/pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
pGEM[®]-T Vector System I (Promega GmbH, Mannheim)
pGEM[®]-T easy Vector (Promega GmbH, Mannheim)
pcDNA5/FRT-Vector (Invitrogen, Karlsruhe)
7-³H Pregnenolon-3-sulfat, 20 Ci/mmol (American Radiolabeled Chemicals Inc. USA)
Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
QIAprep[®] MiniprepKit (Qiagen GmbH, Hilden)
Reaktionsgefäße 2 ml RNase-/DNase-/pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
Roti-fect[®] (Roth GmbH Co KG, Karlsruhe)
RNase Inhibitor, 40 U/μl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
RT-PCR Core Kits (Applied Biosystems GmbH, Karlsruhe)
SafeSeal-Tips gestopfte Pipettenspitzen, RNase-/DNase-/pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
Szintillatorvials mit Deckel (Zinsser, Frankfurt/Main)
Serumpipetten 5 ml/10 ml, steril (Biochrom AG, Berlin)
SMART-RACE Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)
Superfrost Objektträger[®] (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
TaqMan[®] qPCR Mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Toluol (Merck KGaA, Darmstadt)

Trinatriumcitrat-dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

TRIZMA[®] Base (Trihydroxymethylaminomethan) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

Triton X-100 (Serva, Heidelberg)

Trizol[®] Reagent (GibcoBRL, Life Technologies, Kalsruhe)

Trypsin EDTA 10x (PAA Laboratories, Cölbe)

UV-Einmalküvetten Uvette[®] 220-1600 nm (Eppendorf, AG Hamburg)

Versene (Invitrogen, Karlsruhe)

Wasserstoffperoxid 30% (Merck KGaA, Darmstadt)

Wheaton 15 ml Vials (Zinsser, Frankfurt/Main)

X-Gal: 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)

Zellkultur 12-Well-Platten, steril (Biochrom AG, Berlin)

Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

Soweit nicht anders beschrieben wurde bei den Chemikalien reinst. Qualität verwendet.

3.12 Verwendete Seren/Antikörper

- Kaninchenantiserum gegen die menschliche Steroidsulfatase; zur Verfügung gestellt von Dr. B. Ugele, I. Frauenklinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München)
- Biotinylierter Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Kaninchen-IgG (BA 1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Fötale Kälberserum, EU-Standard (PAA Laboratories, Cölbe)
- Kaninchenserum, hitzeinaktiviert bei 55°C/30 min (eigene Produktion)

3.13 Verwendete Geräte

Bunsenbrenner (MAGV, Rabenau-Londorf)

Einbettautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)

Elektrophoresekammer (Kreutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)

Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg)

Variopipetten Eppendorf Reference[®] 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf AG, Hamburg)

Flachgel-Gelelektrophoresekammer „Midi“ 100x150 mm, Gießkammer mit Kamm (Kreutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen)

Flüssigszintillationszähler LS 5000 TD (Beckman Instruments, Fullerton, USA)

GFL 1083 Wärmeschüttelbad (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)

HBI Vortex-Evaporator (Haake Buchler, Saddle Brook, USA)

Haushaltsmikrowellenherd Compact Y50 (Moulinex GmbH, Solingen)

Heraeus Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)

Heraeus Minifuge (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)

HL-Tiefkühlschrank (-80°C)

Kühlschrank und Gefrierschrank (Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)

Laborwasseraufbereitungsanlage MilliQ, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)

Magnetrührer MR2002 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)

Microtom (Reichert Jung AG, Heidelberg)

Mikroskop Leitz DMRM mit Digitalkamera Leica DC300 und Leica IM- Software (Leica GmbH, Bensheim)

Paraffinausgießstation Histoembedder EG 1160 (Leica Instruments GmbH, Nußloch)

Pipetus® Pipettierhilfe (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)

pH-Meter (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)

Power supply 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Golden, USA)

Rotationsmischer REAX2 (Heidolph GmbH, Kelkheim)

Schüttler Heidolph Polymax 1040 (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)

T1 Thermocycler 48 (Whatmann Biometra GmbH, Göttingen)

Tutnauer Systec Autoklav 3850 ELC (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettengel)

Ultra-Turrax® T-8 Dispergierwerkzeug S8 n-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)

UV-Spektrometer (BioPhotometer Eppendorf AG, Hamburg)

UV-Transluminator Biostep (Biostep GmbH, Jahnsdorf)

Vakuum-Pumpe KNF Neuber Typ No. 035.1.2 (Freiburg)

Vortexer Heidolph REAX control (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)

Waage Mettler AE160 F.Nr. 38600 (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PJ300 F.Nr. 33650 (Mettler-Toledo, Giessen)

Wärmeschrank Memmert Typ 3-26 (Schwabach)

Zentrifuge Micra 22R, Hettich GmbH, Tuttlingen)

3.14 Software und benutzte Datenbanken

Bioedit 5.0.6: Erstellung von Alignments (TomHall, North Carolina State University)

BLAST, NCBI: Sequenzvergleich gegen Gen- bzw. Protein-Datenbank

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Boxshade 3.21: Grafische Darstellung von Alignments

(www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Chromas 2.23: Auswertung von Sequenzspuren (www.technelysium.com.au)

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute, Datenbankportal Europa

(www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html)

Ensembl, EBI: Gendatenbank (www.ensembl.org/)

Statistical Software GraphPad3, Demoversion: Statistische Auswertung (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)

HMMTOP: Vorhersage von Transmembrandomänen (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>)

HMMTOP 2.0: Vorhersage von Transmembrandomänen (www.enzim.hu/hmmtop/)

NCBI: Nucleinsäure- bzw. Protein-Datenbankportal USA (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

NetNGlyc: Vorhersage von Glykolysierungsstellen

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

NetPhos: Vorhersage von Phosphorylierungsstellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)

Oligo Analyzer 1.0.2, OligoExplorer 1.1.0: Design von PCR-Primern (Teemu Kuulasma, University of Kuopio, 70211 Kuopio, Finnland)

Phoretix Grabber 3.01: Bildaufnahmesoftware für Fotografie unter UV-Licht (Biostep GmbH, Jahnsdorf)

Primer Express Software TaqMan PCR, Version 2.0: Design von Primern und Sonden für die Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems, Forster City, USA)

TMAP: Vorhersage von Transmembrandomänen

(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/tmap.html>)

TMHMM Server v. 2.0: Vorhersage von Transmembrandomänen

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

TMPred: Vorhersage von Transmembrandomänen

(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

TopPred 2: Vorhersage von Transmembrandomänen (<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>)

Sosui: Vorhersage von Transmembrandomänen (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

SMS2 : sequence manipulation suit 2 (<http://www.sms2.org>)

4 Ergebnisse

4.1 Steroidsulfatase

4.1.1 mRNA-Sequenz und Exon-Intronstruktur des bovinen Steroidsulfatase-Gens

Die erarbeitete bovine Steroidsulfatase-spezifische Sequenz beinhaltet eine 233 bp 5'-UTR, einen 1737 bp Open Reading Frame und eine 234 bp 3'-UTR. Sie wurde mit der Accession No. DQ532016 in Genbank eingetragen. Die 3'-UTR Sequenz endet mit einem Poly A⁺-Tail, dem ein Polyadenylationssignal (AAUAAA) vorausgeht. Da die 3'-UTR Sequenz der humanen Steroidsulfatase aber 4000 bp umfasst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der cDNA Synthese für die 3'-RACE-PCR ein poly-A-Cluster und nicht der wahre polyA⁺ Tail verwendet wurde und die 3'-UTR auch beim Rind deutlich länger ist.

Mittels BLAST-Analyse der klonierten Steroidsulfatase-cDNA Sequenz und der Rinder genomdaten konnte die bovine Steroidsulfatase auf dem X-Chromosom lokalisiert und die Exon-Intron-Grenzen bestimmt werden. Das Rindergen besteht wie das homologe menschliche Gen aus 10 Exonen. Alle Intron-Exon-Grenzen besitzen die typischen Donor- und Akzeptormotive, das heißt jedes Intron beginnt mit einem GT an der 5'-Spliceseite und endet mit einem AG an der 3'-Spliceseite. Die Längen von Exon 2-9 sind bei Mensch und Rind identisch (Tab. 17). Unterschiede gibt es bei Exon 1. Das Exon 1 enthält beim humanen Steroidsulfatasegen das Startcodon, ist aber beim Rind noch vollständig Teil der 5'-UTR, was zu einer Verkürzung des N-Terminus um 15 Basenpaare gegenüber der menschlichen Steroidsulfatase führt. Die Größe der Intronsequenzen lässt sich zurzeit nur schätzen, da noch zahlreiche Lücken in den Rindergenomdaten existieren. Damit kann die Gesamtlänge des Steroidsulfatasegens beim Rind auch nur relativ ungenau mit ca. 93 kb angegeben werden. Sie ähnelt damit aber der Länge des homologen humanen Genes (135 kb).

Tab. 17: Exon-Intron-Struktur des bovinen Steroidsulfatase-Gens. Die Intron-Sequenzen sind in kleinen Buchstaben dargestellt, die Exon-Sequenzen in Grossbuchstaben.

Exon	Länge (bp) bovin (human)	Splicedonor	3' Spliceakzeptor	Introngröße (kb)
1	229 (231)	CGACGA / gtaagt	ttgcag / GGACAT	~ 51.1
2	141 (141)	GCTCAG / gtgcgg	ttccag/ GACTCC	3.0
3	122 (122)	GCTCAG / gtaatg	gctcag/ GAATGG	0.1
4	123 (123)	TGATAG / gtatgg	ccttag/ GCAAGT	~ 3.9
5	424 (424)	ACGTCG / gtgggt	ttttag / GAATGC	~ 6.9
6	137 (137)	GCGTCG / gtacgt	cttcag/ GCAGAG	~ 14.1
7	138 (138)	ACAAAG/ tgaaga	nnnnnn/ GGGGAA	~ 1.6
8	160 (160)	AGACAG/ nnnnnn	ccccag/ GGTCAT	~ 0.6
9	122 (122)	CCAACA/ gtgagt	ccacag/ GCACGT	~ 10.1
10	607 (4923)	GTTACT		

Das bovine Steroidsulfatase-Protein besteht aus 578 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 64,4 kDa. Die vorhergesagte bovine Aminosäuresequenz zeigt mit 77% einen hohen Homologiewert zu ihrem humanen Gegenstück. Ein Aligment der humanen und bovinen Steroidsulfatase-Aminosäuresequenz zeigt mehrere hochkonservierte Bereiche (Abb. 9). Im N-Terminus gibt es jedoch einen deutlichen Unterschied. Er ist beim Rind um 5 Aminosäuren verkürzt.

bSTS	1	-----MMTLLLLLLFLCEAQSRAASKPNEVLLMADDLGIGDPCGYGNKTLRTPNIDRLAR
hSTS	1	MPLRKMKIPFLLLLFFLWEAESAASRPNIILVMADDLGIGDPCGYGNKTLRTPNIDRLAS
bSTS	56	GGVKLTQHLAASPLCTPSRAAFMTGRYPVRSGMASQSQVGVFLEFSASSGGLPSEITFAK
hSTS	61	GGVKLTQHLAASPLCTPSRAAFMTGRYPVRSGMASWSRTGVVFLEFASASSGGLPTDEITFAK
bSTS	116	LLKDQGYSTALIGKWHLGISCHDPGDFCHHPTSHGFDYFHGLPLTNMRDCKLGEYSVFIA
hSTS	121	LLKDQGYSTALIGKWHLGMSCHSKTDFCHHPLHHGFNYFYGISLTNLRDCKPGEYSVFIT
bSTS	176	AFRLVLVLLPMQLIALALLTLVVLKWLGLFRAPPCAELFLFLATLLLGILLGFLHYFRPL
hSTS	181	GFKRLVFLPLQIVGVTLTTLAALNCLGLLHVPLGVVFSILLELAALILLTFLGFLHYFRPL
bSTS	236	NCFLMRNRDITQQPMSYDNLQRLTADAHFLLRRNAETPFLVLSEFLHMTALEFSSKDFA
hSTS	241	NCFMMRNYEITQQPMSYDNLQRLTVEAAQFIQRNTETPFLVLSEFLHMTALEFSSKDFA
bSTS	296	GKSQHGVSYGDAAEEMDWSVGQILDVLDELKLANNTLVYFFSDQGAHVEEVTVKGEVQGS
hSTS	301	GKSQHGVSYGDAVEEMDWSVGQILNLLDELRLANDTLIYFTSDQGAHVEEVS SKGEIHGGS
bSTS	356	NGIYKGGKANNWEGGIRVPGIWRWPGVIQAGLEIDEPTSNDIEFPTVAKLAGSPLEQDRV
hSTS	361	NGIYKGGKANNWEGGIRVPGILRWPRVIQAGQKIDEPTSNDIEFPTVAKLAGAPLEQDRI
bSTS	416	IDGRDLMPLLQMRTORSEHEFLFHYCNSYLNVRWHPNPNSTSIWKAFFFTPKFSPEGANG
hSTS	421	IDGRDLMPLLEKSKQRSDEHEFLFHYCNAYLNVRWHPNPNSTSIWKAFFFTPNENPVGSNG
bSTS	476	CFDTHVCFQCYQYVTHYHDPPLLFEISRDPRENRPLTPITSEPRFWEILEAMQEAARHART
hSTS	481	CFATHVCFQCGSYVTHYHDPPLLFDISKDPRENRPLTPASEPRFYELIKVMQEAADRHRTQ
bSTS	536	LQDVPNQLSLGNLMWKPWQLCCSSILGLSCQCDREDQDGRHSP
hSTS	541	LPEVPDQFSWNNFLWKPWQLCCPSTGLSCQCDREKQDKRLSR

Abb. 9: Boxshade-Diagramm zur Darstellung des Alignments der bovinen und humanen Steroidsulfatase-Aminosäuresequenzen. Übereinstimmungen sind schwarz hinterlegt. Die Abweichungen ohne bzw. mit Ladungsänderung sind grau bzw. weiß hinterlegt.

4.1.2 Expression der Steroidsulfatase in den Rinderplazentomen auf Proteinebene

Immunhistologisch war die Steroidsulfatase nahezu ausschließlich im Zytoplasma von Karunkelepithelzellen nachweisbar. Signalintensität und -verteilung wiesen in diesen Zellen eine deutliche Beziehung zum Trächtigkeitsstadium auf (Abb. 10). Zwischen dem 100.-240. Trächtigkeitstag waren die Signale von schwacher bis mäßiger Intensität und weitgehend auf die Bereiche des Karunkelepithels beschränkt, die an die Chorionplatte und die chorionplattennahen Primär- und Sekundärzotten grenzten (Abb. 10B; Tab. 18). In der späten Gravidität breitete sich das Signal im Karunkelepithel zunehmend entlang der Sekundär- und Tertiärzotten und in Richtung des Karunkelstiels aus. Nach Einsetzen der präpartalen Luteolyse war in allen Teilen des Karunkelepithels ein nahezu homogenes, moderates bis intensives Signal vorhanden (Abb. 10C, D; Tab. 18), wobei das Karunkelepithel die typischen präpartalen Ver-

änderungen, nämlich eine deutliche Abflachung der Zellen bis hin zu Epithellücken, aufwies (Abb. 10E). Zusätzlich zu den Signalen im Karunkelepithel war gelegentlich auch das Zytoplasma einzelner Trophoblastriesenzellen gefärbt. Das Vorkommen spezifischer, Steroidsulfatase-positiver Trophoblastriesenzellen war ausschließlich auf Chorionzotten begrenzt, die von Steroidsulfatase-positivem Karunkelepithel umgeben waren (Abb. 10A, B, 11A). Weiterhin fanden sich in Trophoblastzellen zahlreiche zytoplasmatische, Steroidsulfatase-positive Einschlüsse, die offensichtlich von der Phagozytose abgeschilfter Karunkelepithelzellen herührten (Abb. 10A, E, 11A). In seltenen Fällen fanden sich schwache Farbsignale in vereinzelten Trophoblastriesenzellkernen. Diese Signale traten gleichmäßig verteilt in allen Bereichen des Trophoblasten auf und zeigen keine Abhängigkeit vom Graviditätsstadium. Da sie teilweise auch in den Negativkontrollen (Abb. 11B) auftraten, wurden sie als unspezifisch betrachtet.

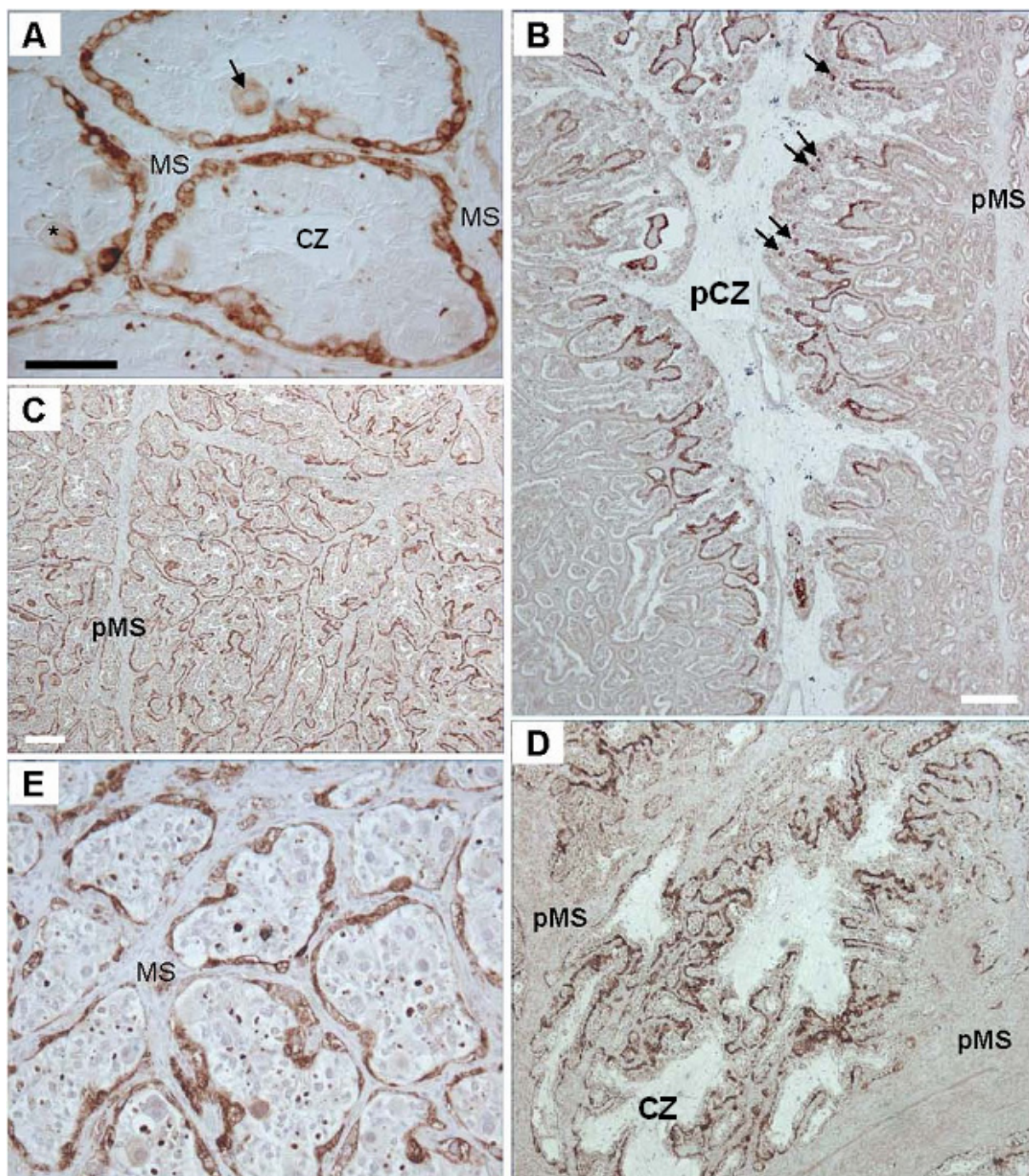


Abb. 10: Immunhistologische Darstellung der Steroidsulfatase (StS) in Rinderplazentomen zu verschiedenen Stadien der Gravidität sowie unter der Geburt. **A)** Querschnitt einer Chorionzotte mit umgebenden Karunkelsepten (Tag 273). Mäßige bis starke zytoplasmatische Färbung in den Karunkelepithelzellen und einzelnen Trophoblastriesenzellen (Pfeil). Im Trophoblast sind zahlreiche Steroidsulfatase-positive Einschlusskörperchen sichtbar. Der Stern markiert eine offensichtlich aus dem Karunkelepithel abschilfernde Zelle, die im Trophoblast phagozytiert wird. **B)** Typisches Steroidsulfatase-Färbemuster von Plazentomen zwischen dem 100. und 240. Trächtigkeitstag (hier: Tag 143). Die Färbung im Karunkelepithel ist weitgehend begrenzt auf die Bereiche entlang des basalen Anteils der Primärzotten. Vereinzelte Steroidsulfatase-positive Trophoblastriesenzellen (Pfeil) sind nur in unmittelbarer Nähe des Steroidsulfatase-positiven Karunkelepithels zu finden. **C, D)** Plazentome von Rindern in der Geburt. Eine mäßige bis starke zytoplasmatische Färbung der Karunkelepithelzellen ist im gesamten Plazentom zu finden. **E)** Plazentom eines Rindes unter der Geburt. Eine große Anzahl an Steroidsulfatase-positivem Zelldetritus ist im Trophoblast vorhanden. Des Weiteren ist das Karunkelepithel abgeflacht und lückenhaft.

CZ: Chorionzotte, pCZ: primäre Chorionzotte, MS: maternales Septum, pMS: primäres maternales Septum. Weißer Balken = 200 µm, schwarzer Balken = 25 µm.

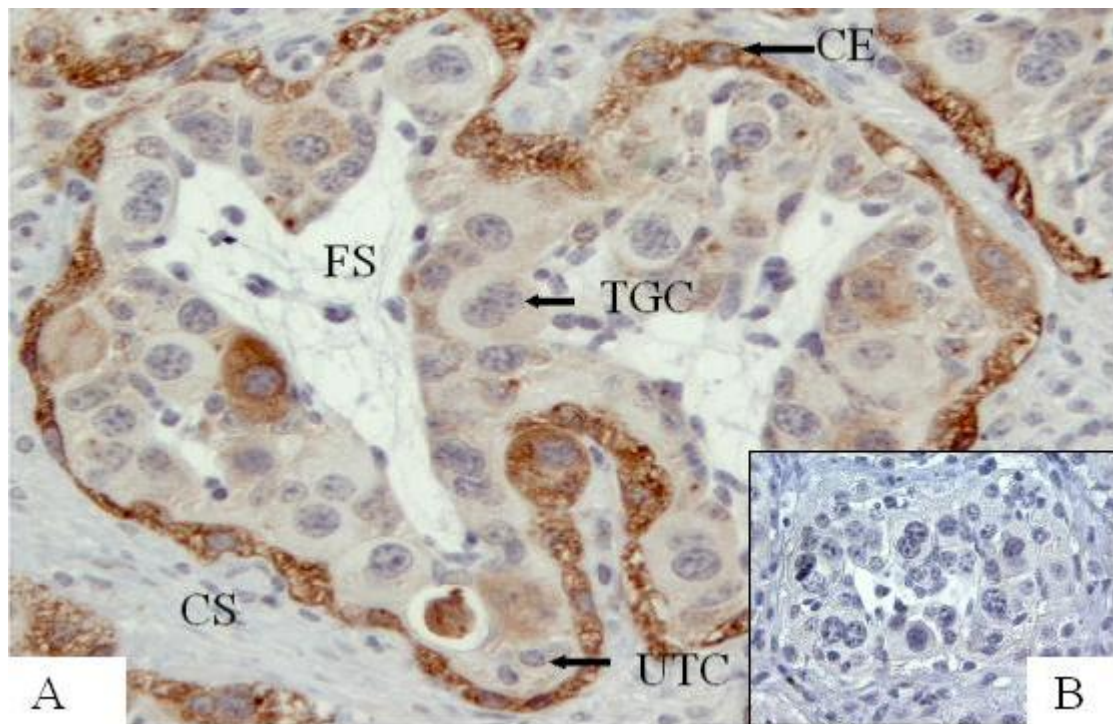


Abb. 11: **A)** Immunhistologischen Darstellung der Steroidsulfatase in Rinderplazentomen (Tag 273; 400fache Vergrößerung). Deutliche zyttoplasmatische Färbung in den Karunkelepithelzellen (CE) und einzelnen Trophoblastriesenzellen (TGC). Im Trophoblast sind zahlreiche Steroidsulfatase-positive Einschlusskörperchen sichtbar. Karunkelstroma (CS), fetales Stroma (FS), einkernige Trophoblastzellen (UTC) und die meisten Trophoblastriesenzellen (TGC) sind nicht gefärbt
B) Negativkontrolle zur immunhistologischen Darstellung der Steroidsulfatase in Rinderplazentomen (Tag 273). Hier wurde das spezifische Steroidsulfatase-Antiserum durch Serum eines nichtimmunisierten Kaninchens ersetzt.

Tab. 18: Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Immunhistochemie für die bovine Steroidsulfatase in den Karunkelepithelzellen entlang definierter Regionen des Zottenbaumes (zu den beurteilten Lokalisationen siehe auch Abb. 8 in Kap. 3.9)

Chorionzotten-region	2. Trimester (Tag)								3. Trimester (Tag)								präpartal			Geburt		
	100	109	115	136	142	155	156	182	183	187	196	211	218	233	235	270	P1	P2	P3	G1	G2	G3
Chorionplattennah																						
primär (basal)																						
primär (apikal)																						
sekundär (basal)																						
sekundär (apikal)																						
tertiär (basal)																						
tertiär (apikal)																						

keine Färbung  intensive Färbung

4.1.3 Expression der Steroidsulfatase in den Rinderplazentomen auf mRNA-Ebene

Mittels konventioneller RT-PCR war in allen untersuchten Rinderplazentomen Steroidsulfatase-mRNA im beobachteten Zeitraum zwischen dem 100. Trächtigkeitstag und der Geburt nachweisbar (Abb. 13). Als Negativkontrolle wurde eine Präparation verwendet, bei der die RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung durch autoklaviertes Wasser ersetzt worden war.

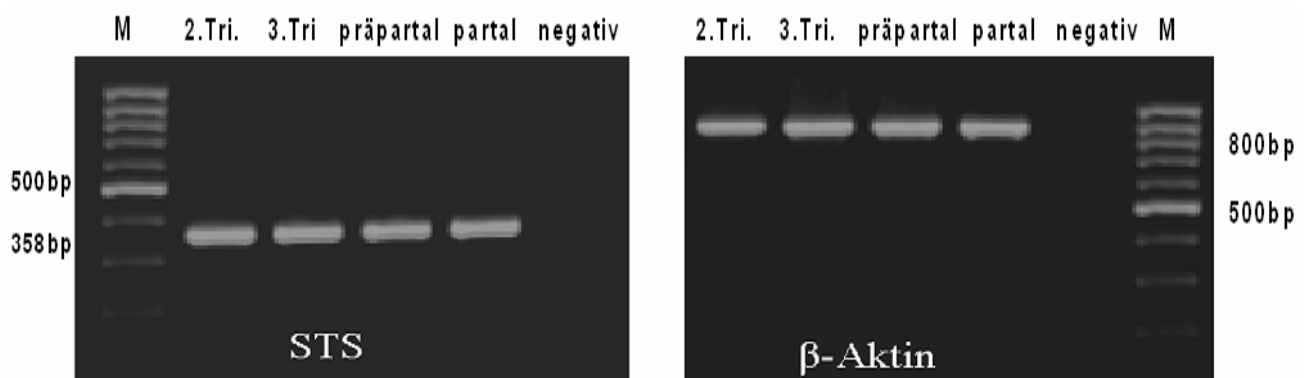


Abb. 13: Nachweis der Steroidsulfatase (STS)-spezifischen mRNA in Rinderplazentomen zu verschiedenen Stadien der Trächtigkeit sowie unter der Geburt mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

Die Expression der Steroidsulfatase im Verlauf der Trächtigkeit wurde auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert. Hier zeigte sich ein Anstieg der relativen Genexpression vom 2. Trimester bis hin zum präpartalen Progesteronabfall um den Faktor 2.7, der allerdings statistisch nicht signifikant war ($p = 0,116$). Die Expression in den Plazentomen der Geburtstiere bewegte sich im Mittel auf einem ähnlichen Niveau wie das der präpartalen Tiere, zeigt aber eine deutlich höhere Streuung der Messwerte (Abb. 14).

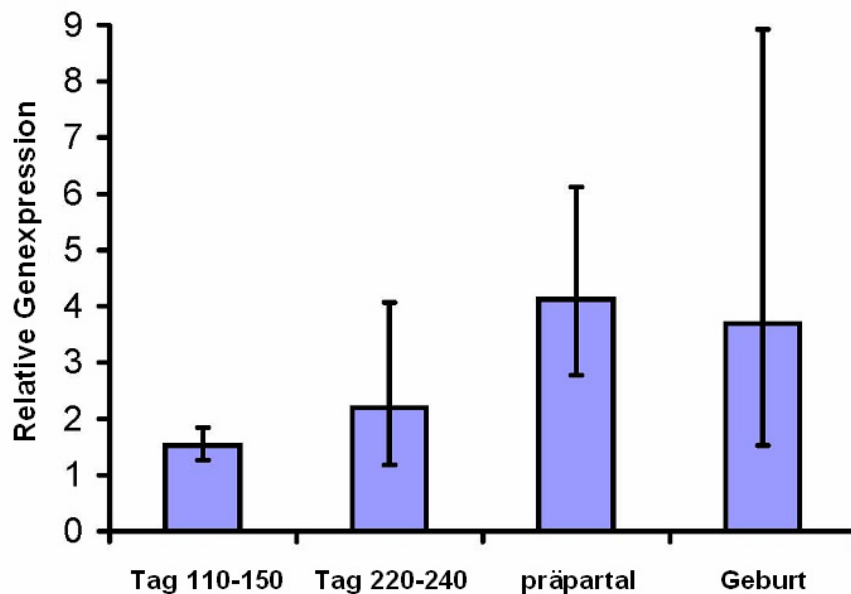


Abb. 14: Expression der Steroidsulfatase-spezifischen mRNA in Rinderplazentomen verschiedener Trächtigkeitsstadien (Tag 110-150, $n = 4$; Tag 220-240, $n = 4$; präpartal, $n = 3$) sowie unter der Geburt ($n = 3$). Dargestellt ist der geometrische Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Dies sind die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR unter Verwendung von GAPDH als Referenzgen. Der Einfluss der Beobachtungsgruppe ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,116$).

4.1.4 Substrate der Steroidsulfatase

HEK293-Zellen waren nach transienter Transfektion mit der bovinen Steroidsulfatase in der Lage, Estronsulfat und Pregnenolonsulfat zu hydrolysieren (Abb. 15). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C waren im dargestellten Versuch 64% des eingesetzten Estronsulfats bzw. 51% des angebotenen Pregnenolonsulfats umgewandelt. Zellhomogenate von HEK293-Zellen, die mit dem Vektor ohne Insert scheintransfiziert wurde, zeigten dagegen deutlich geringere Substratumwandlungen. Auch in den Versuchsansätzen mit hitzeinaktivierten transfizierten Zellen (20 min. im kochenden Wasserbad) sowie scheintransfizierten und hitzeinaktivierten Zellen wurden nur basale Umwandlungsraten gemessen.

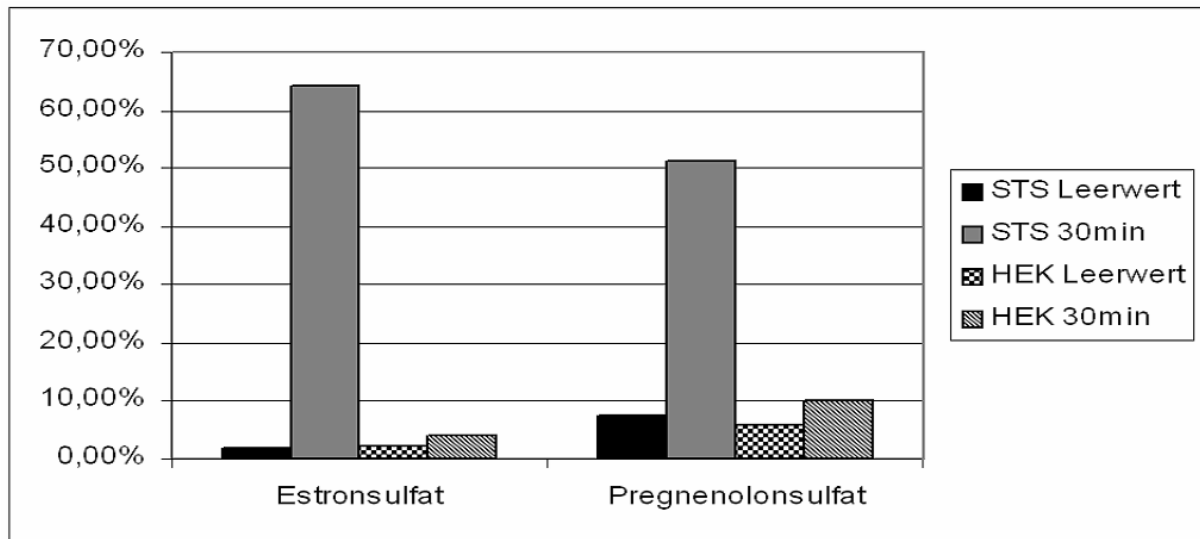


Abb. 15: Umwandlung von ^3H -Estronsulfat bzw. ^3H -Pregnenolonsulfat durch $1,5 \times 10^6$ HEK293-Zellen nach Transfektion mit der bovinen Steroidsulfatase (STS). Dargestellt ist der prozentuelle Anteil des in die Inkubationsansätze eingebrachten Substrats (3,67 bzw. 1,05 pmol/100 μl), welcher nach der 30-minütigen Inkubation hydrolysiert war (STS 30min). In Kontrollexperimenten wurde die Umwandlung durch hitzeinaktivierte (STS Leerwert), scheintransfizierte (HEK 30min) sowie scheintransfizierte und hitzeinaktivierte Zellen (HEK Leerwert) gemessen.

4.1.5 Steroidsulfatase mRNA Expression in verschiedenen Organen des Rindes

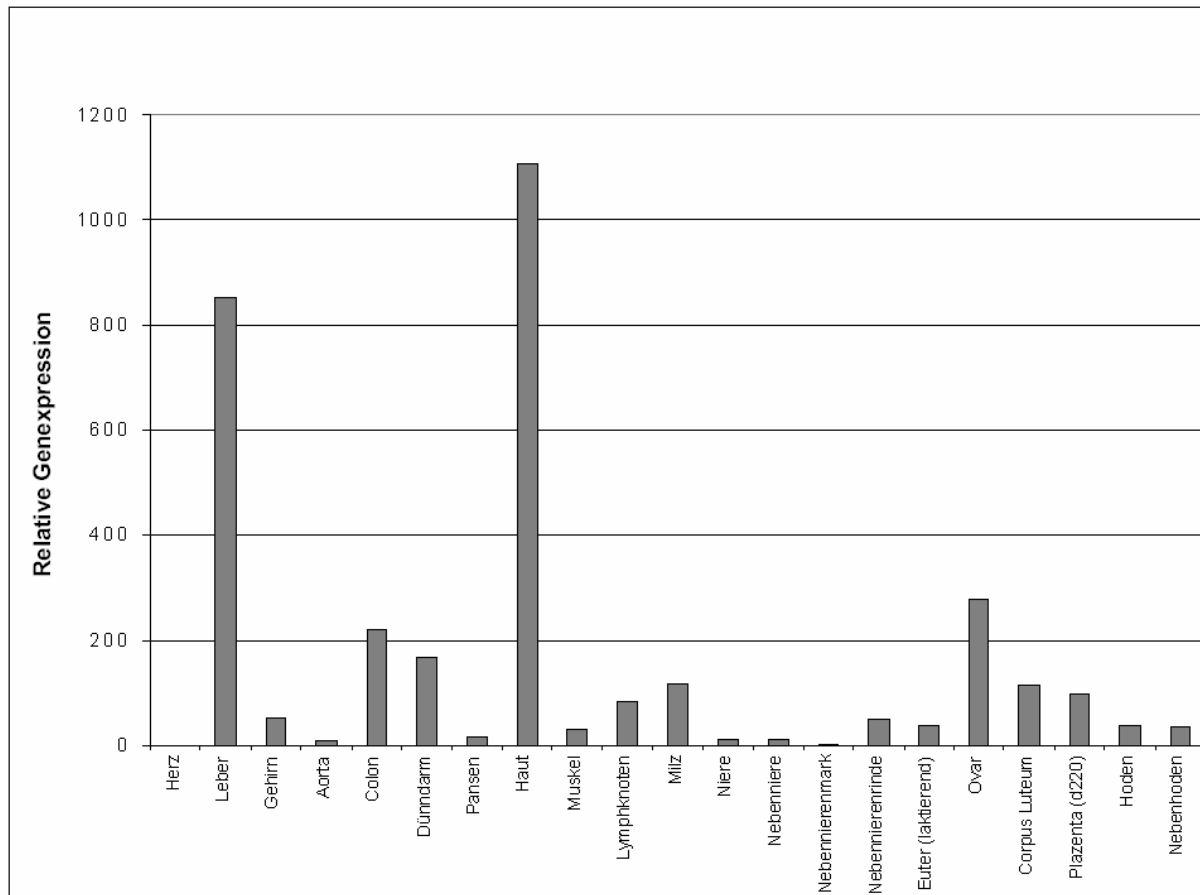


Abb. 16: Relative Expression Steroidsulfatase-spezifischer mRNA in verschiedenen Organen des Rindes. Ergebnisse der Real-Time RT-PCR unter Verwendung von GAPDH als Referenzgen.

Die Steroidsulfatase-mRNA war in einer Vielzahl von Geweben nachweisbar (Abb. 16). Besonders hoch exprimiert war sie in Haut, Leber und Ovar. Die Plazentaprobe zeigt eine vergleichsweise mittlere Expression.

4.2 Soat

4.2.1 Nachweis von fünf Varianten auf mRNA-Ebene in der Rinderplazenta

Bei der Verwendung eines Primerpaares, welches den gesamten open reading frame des bovinen Soat überspannt, wurden mittels RT-PCR und Sequenzierung in Rinderplazentomproben insgesamt fünf mRNA-Varianten gefunden. Variante 1 entspricht mit ihrem 1134 bp open reading frame der Größe des humanen Soat open reading frames. Variante 2 (958 bp) und Variante 3 (750 bp) sind deutlich kleiner als der humane Soat, während Variante 5 (1331 bp) deutlich größer ist als dieser. Wurden die Produkte im Gel elektrophoretisch aufgetrennt, so

fiel auf, dass die Banden von Variante 1 und 2 am deutlichsten zu sehen waren, während die Banden von Variante 3 in allen Proben nur schwach und die Bande von Variante 5 ebenfalls schwach und nicht bei allen Tieren zu sehen ist (Abb. 17). Am schwierigsten im Gel zu identifizieren war jedoch Variante 4, da sie mit ihren 1155 bp nur 21 bp länger ist als Variante 1. Alle fünf Varianten wurden aus mehreren Proben getrennt isoliert und sequenziert und die Varianten 1 bis 4 in die Genbank eingetragen: Soat-Variante 1 (EF186076), Soat-Variante 2 (EF495204), Soat-Variante 3 (EF495205) und Soat-Variante 4 (EF495206). Variante 5 konnte bisher noch nicht eingetragen werden, da derzeit noch nicht genügend übereinstimmende Klone vorliegen.

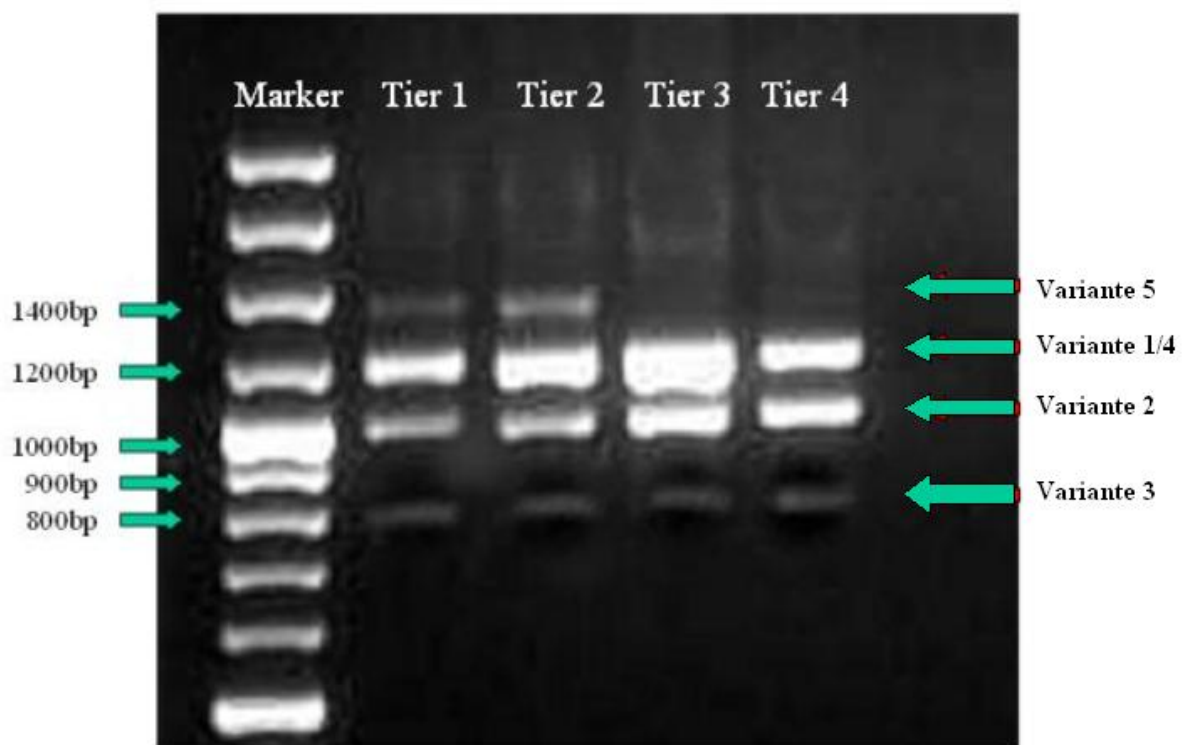


Abb. 17: Elektrophoretische Analyse von RT-PCR-Produkten, welche unter Verwendung eines Primerpaares zur Amplifikation des gesamten open reading frames des bovinen Soats gebildet wurden. Es traten in den Rinderplazentomen insgesamt fünf Varianten auf. Die RT-PCR-Produkte der Varianten 1 und 4 können aufgrund des geringen Größenunterschiedes von 21 bp nicht getrennt werden. Als Negativkontrolle wurde eine Präparation verwendet, bei der die RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung durch autoklaviertes Wasser ersetzt worden war. Es zeigte sich keine Bande (in Abb. 17 nicht dargestellt).

4.2.2 Sequenzanalyse der bovinen Soat-Varianten

Die Ergebnisse der Sequenzierung der bovinen Soat-Varianten nach Klonierung wurden mit den Exonen des humanen Soats (Genbank Accession no. EF437223) und den Rindergenomdaten verglichen. Der bovine Soat konnte so dem Chromosom 6 zugeordnet werden. Das Rindergenom besteht wie das homologe menschliche Gen aus 6 Exonen (siehe Tab. 19). Alle Intron-Exon-Grenzen besitzen die typischen Donor und Akzeptormotive, das heißt jedes Intron beginnt mit einem GT an der 5'-Splicesite und endet mit einem AG an der 3'-Splicesite. Das Exon 1' entsteht durch ein zusätzliches Splicing des Introns zwischen Exon 1 und 2. Unterschiede zur humanen Sequenz hinsichtlich der Basenpaaranzahl treten nur bei den Exonen 1 (Mensch: 525 bp/Rind: 377 bp) und 6 (Mensch: 435 bp/Rind: 215 bp) auf. Exon 1' konnte bisher noch bei keiner der anderen untersuchten Spezies nachgewiesen werden.

Tab. 19: Exon-Intron-Struktur des bovinen Soat mit Darstellung der Exon-Intron-Grenzen.

Die Exon-Sequenzen wurden in Großbuchstaben und die Intron-Sequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt.

Exon	Länge (bp)	5'-Splice Donor	3'-Splice Akzeptor	Intronlänge (kb)
1	377	TCTCAG / gtaagt	tagcag / CAAAGA	5.6
1'	197	CTTAGT / gtaagt	tttcag / CATCAG	8.0
2	119	ACATAG / gtctgt	tttcag / GAATCA	1.6
3	89	CTTAAG / gtaagg	tcttag / ATCGGG	3.6
4	176	GCAGAG / gtacag	tggttag / GTGCAG	9.6
5	158	TTGCTG / gtacgt	atttag / CATATA	1.5
6	215	AAGTAG		

Die Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen dem humanen Soat und der Variante 1 des bovinen Soat beträgt 77,7%. Unterschiede findet man vor allem im Bereich des C-Terminus des Proteins (Abb. 18).

Mensch	MRANCSSSSACPANSSSEELPVGLEVHGNLELVFTVVS	TMMGLLMFSLGCS
Rind V1	MRANCSSGLACPANSSEELPEGLKAFGNLDLVFTVVS	ALMIGLLMFSLGCS
Mensch	VEIRKLWSHIRRPWGIAVGLLCQFGLMPETAYLLA	ISFSLKPVQAIIVLIMG
Rind V1	VEVQKLWGHIRRPWGIAVGMLCQFGLMPLIAYLLI	ISFSLKPLQAIIVLIMG
Mensch	CCPGGTISNIFTFWVDGDMDSLISM TTCSTVAAL	GMMPLCIYLYTWSWSLQQ
Rind V1	CCPGGTISNIFTFWVDGDMDSLISM TTCSTMAAL	GMMPLCIYLYTWSWNLBQ
Mensch	NLTIPYQNI GITLVCLTIPVAFGVYVNYRWPQSKIIL	KIGAVVGGVLLLVV
Rind V1	NLTIPYQNI GITLVCLIIIPVAFGIYVNYRWPQSKIIL	KIGAIAGGLLFLVV
Mensch	AVAGVVLAKGSWNSDITLLTISFIFPLIGHVTGFL	LALFTHQSWQRCRTISL
Rind V1	TGAGMVLAKGFNSDITLLMISFIFPLIGHVTGFL	LALFTHQSWQRCRTISL
Mensch	ETGAQNIQMCIITMLQLSF TAEHLVQMLSEFPL	AYGLFQLIDGFLIVAA YQTYK
Rind V1	ETGTQNVQMCFITMLQLSF TAEQLVQIFGEV	LAYGLFQMLNGFFMVAA YKMYK
Mensch	RRLKNKHGKKNSGCTEVCHTRKSTSSRETNA	FLEVNEEGAITPGPPGPMDCH
Rind V1	RRLKNKHGNEKPSQCEARHRRKSTSPKETTA	FLEVNEEATLSPGPSGPVDPH
Mensch	RALEPVGHITSCE	
Rind V1	GAPTPTGDIARAK	

Abb. 18: Box-Shade-Alignment der Proteinsequenzen des humanen Soat (Genbank Accession no. ABO38126) und der bovinen Soat-Variante 1 (Genbank Accession no. ABM68134). Übereinstimmungen sind schwarz hinterlegt. Die Abweichungen ohne bzw. mit Ladungsänderung sind grau bzw. weiß hinterlegt.

Die Varianten 2-5 werden durch Deletionen vollständiger Exone und/oder Insertion des zusätzlichen Exons 1' gebildet (Abb. 19). Variante 2 entsteht durch Deletion des Exons 4. Durch den Verlust des Exons 4 entsteht ein Rasterschub. Dadurch verändern sich die von Exon 5 und 6 kodierten Aminosäuren und es kommt zu einem vorzeitigen Stopcodon. Das Protein der Variante 2 ist statt 319 Aminosäuren nur noch 240 Aminosäuren lang (Abb. 20). Variante 3 beinhaltet eine Deletion der Exone 2-4, ohne dass es zu einer Veränderung des Leserasters kommt. Dem Protein fehlen gegenüber Variante 1 128 Aminosäuren, die Aminosäurenabfolge am N- bzw. C-Terminus bleibt jedoch erhalten. Variante 4 und 5 zeichnen sich durch die Insertion des zusätzlichen Exons 1' aus. Variante 4 hat zusätzlich noch eine Deletion des Exons 4, dies wirkt sich auf der Proteinebene aber nicht aus, da das zusätzliche Exon 1' mehrere Stopcodons enthält.

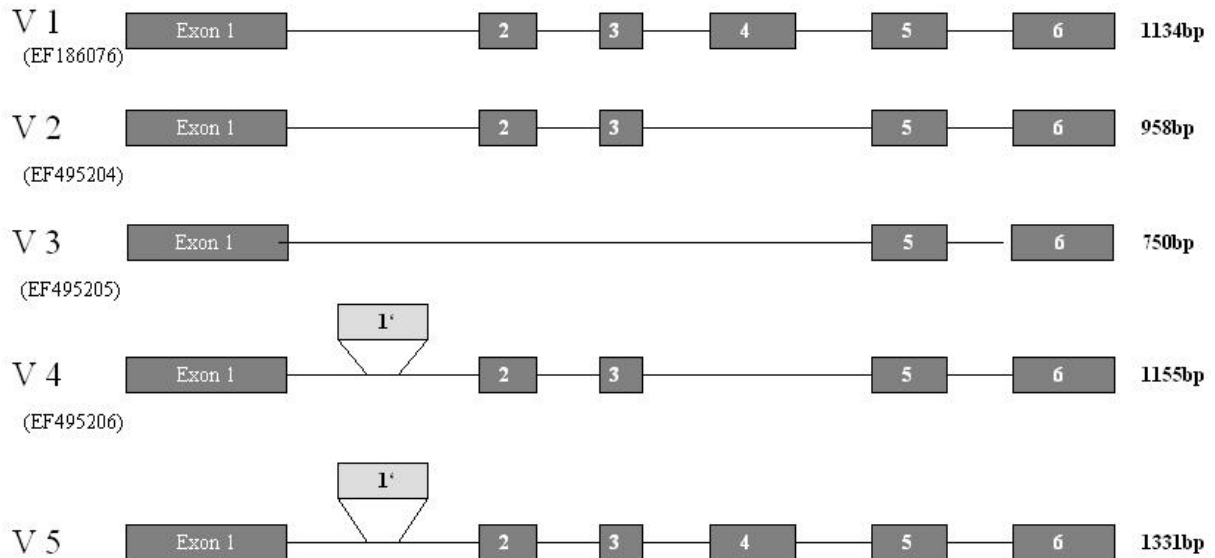


Abb. 19: Schematische Darstellung der Exonstrukturen der bovinen Soat-Varianten 1-5 mit den Genbank Accession Numbers der Varianten 1-4.

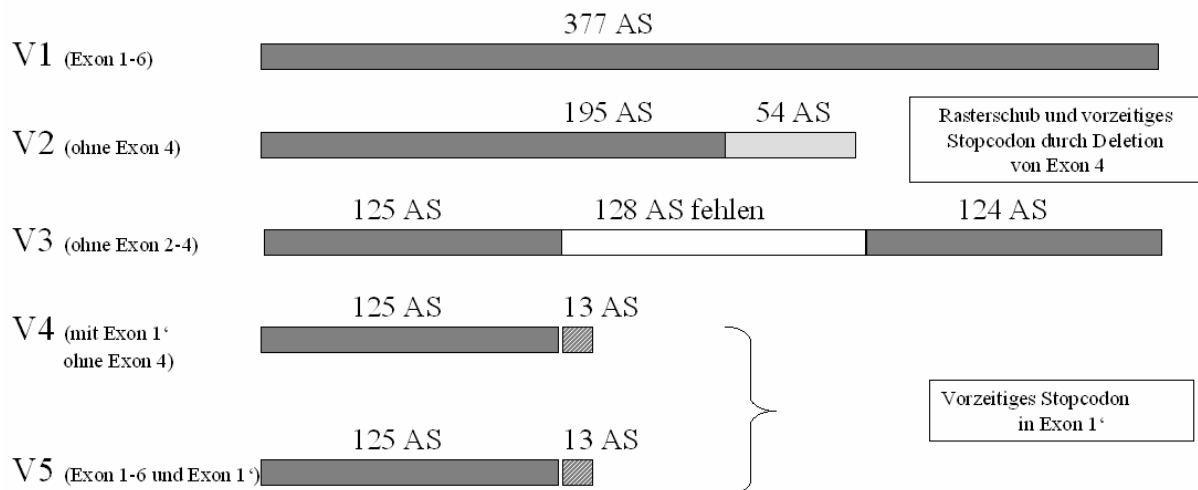


Abb. 20: Hypothetische, schematische Darstellung der bovinen Soat-Varianten 1-5 auf Proteinebene (AS = Aminosäuren).

Da sich das PCR-Produkt für Variante 4 bei Verwendung des open reading frame-überspannenden Primerpaares in der Gelelektrophorese aufgrund des geringen Größenunterschiedes zur Variante 1 kaum isoliert darstellen lässt, wurden weitere PCRs durchgeführt. Ziel war es zu prüfen, ob die Varianten 4 und 5 in allen Trächtigkeitsstadien zu finden sind. Bei

Prüfung auf das Vorhandensein der Insertion (Exon 1') wurde zunächst ein Primerpaar verwendet, das in Exon 1 bzw. 3 bindet. Die erwartete Doppelbande fand sich bei allen getesteten Tieren (Abb. 21).

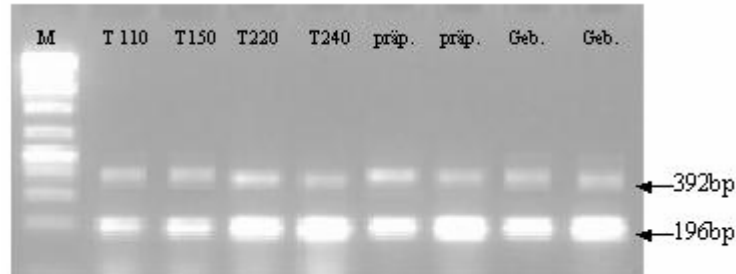


Abb. 21: Analyse der Produkte aus der RT-PCR unter Verwendung eines an Exon 1 bzw. Exon 3 bindenden Primerpaars mittels Agarosegelelektrophorese. Die Bande bei 196 bp entspricht den Varianten 1 und 2. Die 392 bp-Bande kommt durch die Insertion des Exons 1' bei den Varianten 4 und 5 zustande. Sie ist deutlich schwächer ausgeprägt als die Bande der Varianten 1 und 2, aber unabhängig vom Trächtigkeitsstadium in allen untersuchten Plazentomen enthalten. Als Negativkontrolle wurde eine Präparation verwendet, bei der die RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung durch autoklaviertes Wasser ersetzt worden war. Es zeigte sich keine Bande (hier nicht dargestellt)

(T: Trächtigkeitstag, präp.: präpartal, Geb.: Geburt, M: Größenmarker).

Anschließend wurde noch geprüft, ob auch alle getesteten Tiere über die Variante 4 verfügen. Deshalb wurde ein Primerpaar verwendet, das auf Exon 1' bzw. Exon 6 bindet. Variante 4 zeigt sich in dieser PCR als 620 bp großes Fragment, Variante 5 als 817 bp großes Fragment. Es zeigte sich, dass nicht alle untersuchten Plazentomproben über die Varianten 4 und 5 verfügen, sondern einige nur eine von beiden besaßen. Dabei konnte kein Bezug zum Trächtigkeitsstadium festgestellt werden (Abb. 22).

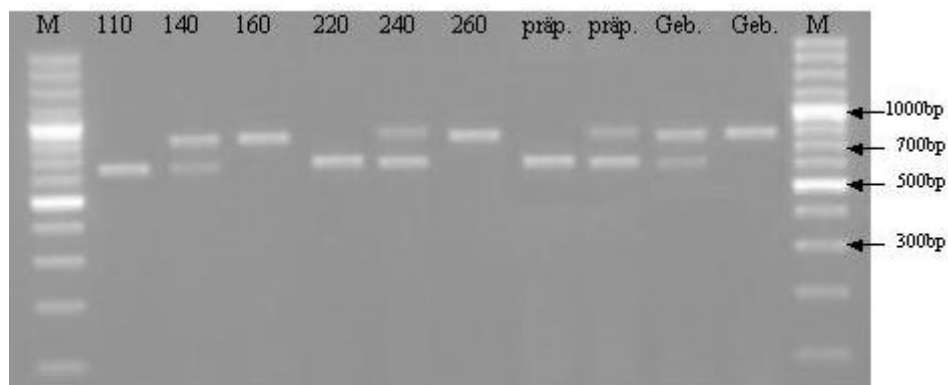


Abb. 22: Analyse der Produkte aus der RT-PCR unter Verwendung eines auf den Exons 1' bzw. Exon 6 bindenden Primerpaars mittels Gelelektrophorese. Die Bande bei 620 bp entspricht der Variante 4, die Bande bei 817 bp der Variante 5 des bovinen Soats. Als Probenmaterial dienten Plazentome aus dem 2. und 3. Trimester der Gravidität (Tag als Zahl angegeben), der präpartalen Phase (präp.) und der Geburt (Geb.). Die Varianten 4 bzw. 5 treten gemeinsam und einzeln auf. Es ist kein Einfluss des Graviditätsstadiums auf die Expression erkennbar. Als Negativkontrolle wurde eine Präparation verwendet, bei der die RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung durch autoklaviertes Wasser ersetzt worden war. Es zeigte sich keine Bande (hier nicht dargestellt) M: Größenmarker.

Zur Vorhersage von Transmembrandomänen wurden die Nukleotidsequenzen der Soat-Varianten in die Aminosäuresequenzen übersetzt und mit den Programmen TMAP, TMHMM 2.0, TMPred, TopPred2, HMMTOP, Sosoui, sowie NetNGyc und NetPhos bearbeitet. Favorisiert wurde das von TopPred2 mit der Kyte Doolittle Scale erstellte Modell, da es für die bovine Variante 1 am besten zu dem von Geyer et al. (2007) vorgeschlagenen Modell des humanen Soats passt. Dieser Algorithmus wurde deshalb auch für die anderen bovinen Varianten übernommen. Die Modelle sehen wie folgt aus:

Variante 1: 7 Transmembrandomänen, N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär, Glykosylierungen an Position 4 und 14, Phosphorylierungen an den Aminosäuren 52, 325, 335, 337, 342, 354 und 368 wahrscheinlich.

Variante 2: 4 Transmembrandomänen, N-Terminus und C-Terminus extrazellulär, Glykosylierungen an Position 4 und 14, Phosphorylierungen an der Aminosäure 52 wahrscheinlich.

Variante 3: 3 Transmembrandomänen (entsprechen Domäne 1, 2 und 7 von Variante 1), N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär, Glykosylierungen an Position

4 und 14, Phosphorylierungen an den Aminosäuren 52, 197, 207, 209, 214, 226 und 240 wahrscheinlich.

Variante 4: 2 Transmembrandomänen (entsprechen Domäne 1 und 2 der Variante 1), N-Terminus und C-Terminus extrazellulär, Glykosylierungen an Position 4 und 14, Phosphorylierungen an den Aminosäuren 52 und 126 wahrscheinlich.

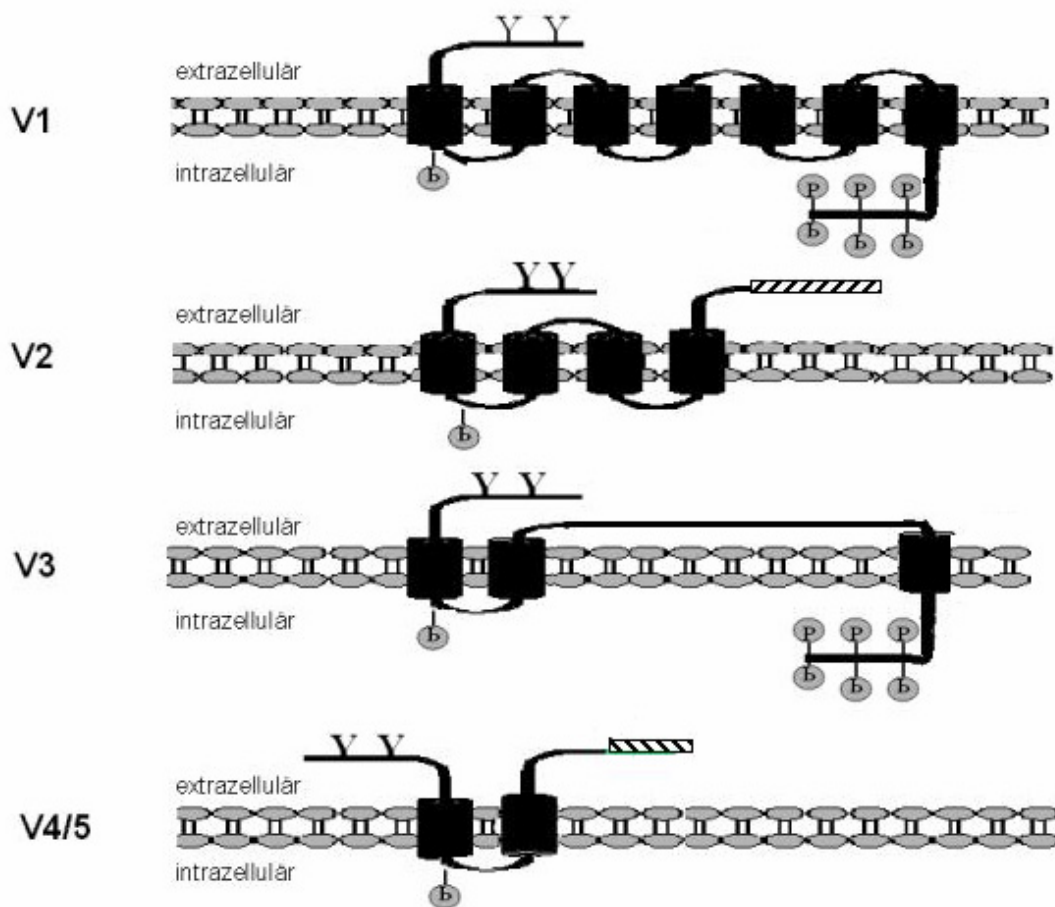


Abb. 23: Membrantopologiemodelle der bovinen Soat-Varianten 1 bis 5. Schraffiert dargestellt sind die Molekülbereiche, in denen es durch Insertion (Varianten 4 bzw. 5) oder Deletion (Variante 2) zu einem Rasterschub und Änderungen der Aminosäuresequenz kommt.

4.2.3 Trächtigkeitsprofil der Soat-Expression in der Rinderplazenta auf mRNA-Ebene

Für die Quantifizierung der Soat-Expression in den Rinderplazentomen auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR wurde ein Primer-Sonden-System verwendet, das am Übergang von Exon 5 zu Exon 6 platziert ist und damit alle 5 identifizierten Soat-Varianten erfasst. Die gemessene Genexpression war im maternalen Teil der Plazentome signifikant höher als im fetalen Teil ($p < 0,0001$). Während in den Kotyledonen die Messwerte auf niedrigem Niveau relativ konstant blieben, war in den Karunkeln ein Anstieg in der unmittelbaren präpartalen Phase sowie unter der Geburt zu beobachten, der sich in der zweifaktoriellen ANOVA jedoch als statistisch nicht signifikant erwies ($p = 0,995$) (Abb. 24).

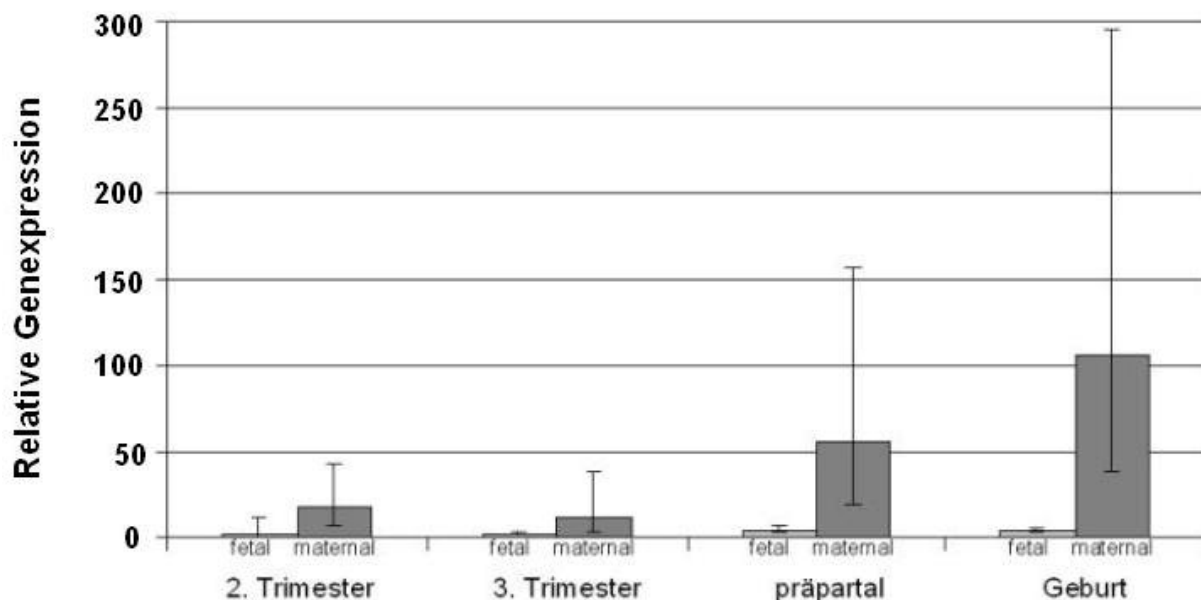


Abb. 24: Expression der Soat-spezifischen mRNA im fetalen bzw. maternalen Anteil von Rinderplazentomen in verschiedenen Trächtigkeitsstadien sowie unter der Geburt (Gruppengröße: jeweils $n=3$). Die Bestimmung erfolgte mittels Real-Time RT-PCR unter Verwendung von GAPDH als Referenzgen.

4.2.4 Soat-mRNA Expression in verschiedenen Rinderorganen

Auch hier wurde für die Real-Time RT-PCR das Primer-Sonden-System verwendet, das am Übergang von Exon 5 zu Exon 6 platziert ist und alle Soat-Varianten erfasst. Bei den untersuchten Organproben wurde die niedrigste relative Genexpression in der Niere gefunden. Die-

se wurde mit 1 gleichgesetzt und die Genexpression aller anderen Organe als Vielfaches dieses Wertes ausgedrückt. Die höchsten Expressionen wurden in den Hoden, in der Haut und in der Nebennierenrinde gemessen. Eine deutliche Expression war neben der Plazenta auch in Leber, Pansen, Dünndarm, Lymphknoten, Euter und Ovar zu finden. Auch in einer reinen Karunkelepithelzellkultur (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pfarrer, Tierärztliche Hochschule Hannover) (ZK) konnte Soat-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 25).

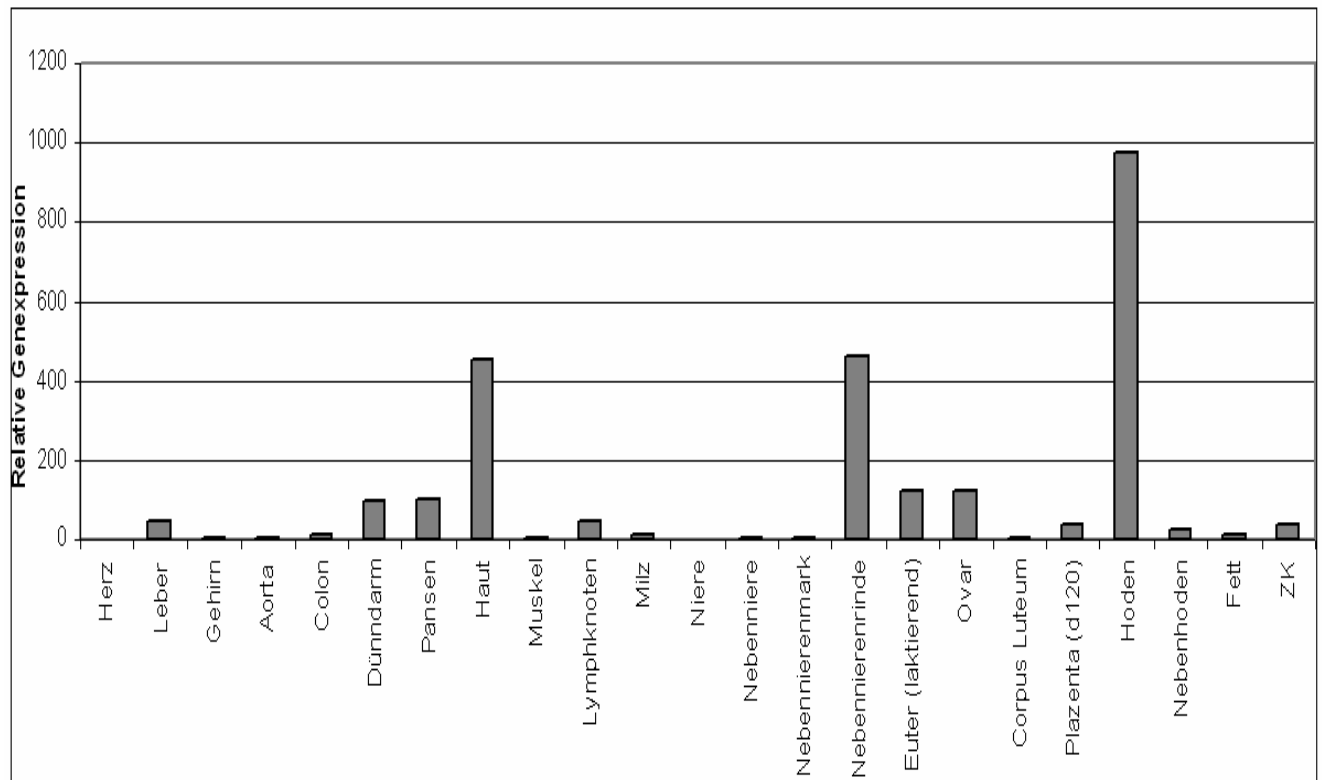


Abb. 25: Relative Expression Soat-spezifischer mRNA in verschiedenen Organen des Rindes. Ergebnisse der Real-Time RT-PCR unter Verwendung von GAPDH als Referenzgen. ZK: reine Karunkelepithelzellkultur.

4.2.5 Transport von Steroidsulfaten in Soat-transfizierten HEK293-Zellen

Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften des bovinen Soat bezüglich des Imports von Estronsulfat, DHEA-Sulfat bzw. Pregnenolonsulfat wurden HEK293-Zellen mit einem Plasmid transient transfiziert, das den open reading frame der bovinen Soat-Variante 1 enthielt (Kap. 3.8.2). Als Kontrolle dienten Zellen nach Scheintransfektion mit dem Vektor ohne Insert. In Gegenwart von Natriumionen zeigten die Soat-transfizierten Zellen eine deutliche Steigerung der Steroidsulfataufnahme gegenüber der Kontrolltransfektion. Die Steigerung betrug das 14,4-fache für Estronsulfat, das 9,5-fache für DHEA-Sulfat und das 2,6-fache für

Pregnenolonsulfat. In Abwesenheit von Natriumionen war nur ein geringer bzw. kein Unterschied in der Aufnahme von Steroidsulfaten im Vergleich zwischen Soat-transfizierten Zellen und den Kontrollzellen zu beobachten. Im Vergleich zur Inkubation in natriumhaltigem Medium zeigten Soat-transfizierte Zellen in Abwesenheit von Natriumionen eine um den Faktor 5,3 verminderte Aufnahme von Estronsulfat. Die Aufnahme von DHEA-Sulfat bzw. Pregnenolonsulfat war in Abwesenheit von Natriumionen um den Faktor 5,4 bzw. 2,6 verringert. Die niedrige Aktivität von Zellen aus Scheintransfektionen zeigte keine deutliche Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit von Natriumionen (Abb. 26).

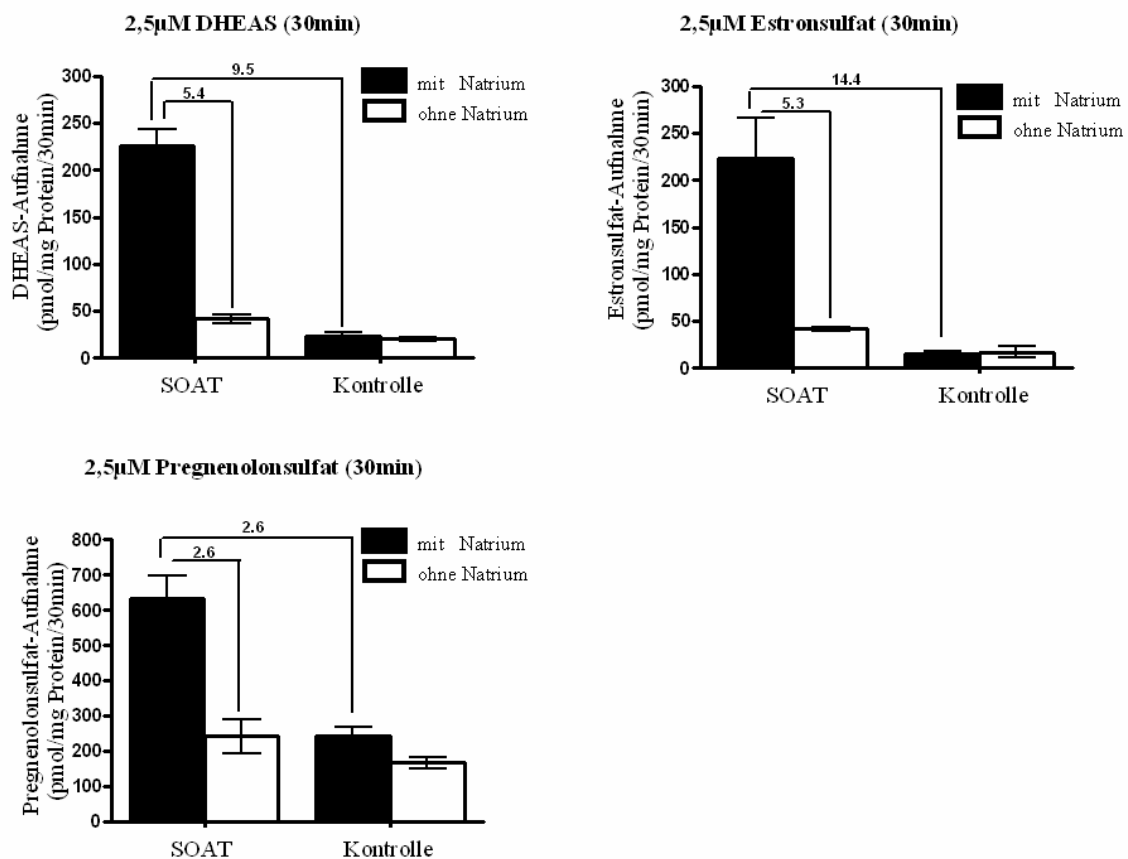


Abb. 26: Aufnahme von ^3H -DHEA-Sulfat, ^3H -Estronsulfat und ^3H -Pregnenolon durch HEK293-Zellen nach transienter Transfektion mit der bovinen Soat-Varianten 1 bzw. einem Vektor ohne Insert (Kontrolle) in An- bzw. Abwesenheit von Natriumionen. Gemessen wurde jeweils im 4-fach Ansatz in 3 Versuchen. Die Zahlen auf den Linien geben den x-fachen Unterschied zwischen den bezeichneten Ansätzen an.

5 Diskussion

5.1 Struktur des bovinen Steroidsulfatase-Gens

Das humane und das bovine Steroidsulfatase-Gen zeigen eine große Ähnlichkeit. Beide sind auf dem X-Chromosom lokalisiert, ihre Open Reading Frames weisen eine ähnliche Größe auf (human: 1752 bp, bovin: 1737 bp) und beide sind in 10 Exonen organisiert. Die Homologie der Aminosäuresequenzen beträgt 77%. Auch die errechnete Größe des Proteins ist mit 65,5 kDa beim humanen Protein und 64,45 kDa beim Protein des Rindes sehr ähnlich und entspricht den gefundenen Banden im Western Blot (siehe Anhang). Einen Unterschied gibt es in Exon 1. Es enthält beim humanen Steroidsulfatase-Gen das Startcodon, ist aber beim Rind nichtkodierend, was im Vergleich zur menschlichen Steroidsulfatase zu einer Verkürzung des N-Terminus um 15 Basenpaare bzw. 5 Aminosäuren führt. Ein weiterer Unterschied ist die Länge der 3'-UTR. Bei der bovinen Sequenz wurden nur 234 bp gefunden, während sie beim Menschen ca. 4000 bp lang ist. Eventuell liegt hier ein Fehler in der cDNA-Synthese vor, so dass statt dem Poly-A-Schwanz ein Poly-A⁺-Cluster von dem Poly-T-Primer erkannt wurde. Insgesamt zeigt die Steroidsulfatase hohe Übereinstimmung zwischen dem humanen und dem bovinen Gen sowie die Lokalisation beider Gene auf dem X-Chromosom, dass die Steroidsulfatase hoch konserviert ist.

5.2 Diskussion der Steroidsulfatase-Expression in der Rinderplazenta

Die Steroidsulfatase wurde immunhistochemisch vor allem in den Karunkelepithelzellen und wesentlich seltener in Trophoblastriesenzellen nachgewiesen. Dieses Resultat passt zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen, nach denen in Rinderplazentomen die Steroidsulfatase-Aktivität signifikant höher im maternalen Anteil nachgewiesen werden konnte, verglichen mit dem fetalen Anteil (Mattioli 1984; Möstl 1986; Hoffmann et al. 2001a). Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit des Steroidsulfatase-Expressionsmusters in den Karunkelepithelzellen vom Trächtigkeitsstadium gezeigt werden. Zwischen Tag 100 und 240 der Trächtigkeit waren die Signale nur schwach bis moderat ausgeprägt und im wesentlichen auf den chorionplattennahen Bereich sowie die Region benachbart zu basalen Primär- und Sekundärzotten begrenzt. Von ca. Tag 270 der Trächtigkeit bis zu ihrem Ende war dann eine Ausbreitung des Signals in die Tiefe des Kryptensystems bis zum Karunkelstiel und eine Intensivierung der Signale zu beobachten. Eine ähnliche präpartale Ausbreitung der Expression konnte bereits für den Glukokortikoidrezeptor in Trophoblastriesenzellen und Karunkelepithelzellen (Boos et al. 2000)

sowie für die Cyclooxygenase II (Schuler et al. 2006b) und die 17 α -Hydroxylase-C17,20-lyase (Schuler et al. 2006a) in einkernigen Trophoblastzellen festgestellt werden. Dies weist auf eine ähnliche Regulation der Expressionen hin.

Die Ergebnisse aus der Real-Time RT-PCR zeigen wie die Immunhistologie eine präpartale Aufregulation der Steroidsulfatase an, auch wenn diese auf der mRNA-Ebene nicht statistisch signifikant ist. Die eher moderate Aufregulation auf der mRNA Ebene, verglichen mit der sehr deutlichen Signalausbreitung und Intensivierung auf Proteinebene, kann dadurch erklärt werden, dass es präpartal und unter der Geburt zu einer deutlichen Reduktion des Karunkelepithels, verbunden mit einer Abnahme der Zellzahl, Abflachen der Zellen und zum partiellen Verlust des Epithels kommt. Dieser Prozess beginnt um den 250. Trächtigkeitstag ebenfalls im oberflächlichen Teil des Plazentoms und setzt sich bis zur Geburt in Richtung Karunkelstiel fort (Björkman 1954; Woicke et al. 1986). Dies ist wahrscheinlich auch für die Heterogenität der Real-Time RT-PCR-Ergebnisse in der Gruppe der Geburtstiere mitverantwortlich. Die fast ausschließliche Lokalisation der Steroidsulfatase im Karunkelepithel bietet in Verbindung mit den präpartalen Veränderungen in der Plazentomarchitektur eine Erklärung für frühere gegensätzliche Ergebnisse zum Verlauf der Steroidsulfatase-Aktivität in der Spätgravidität. Der in früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe festgestellte Abfall der Steroidsulfatase-Aktivität in den Karunkeln erklärt sich offensichtlich dadurch, dass das Probenmaterial ausschließlich aus den oberflächlichen Bereichen der Karunkeln entnommen wurde (Hoffmann et al. 2001a), in denen das Karunkelepithel unter der Geburt weitgehend reduziert war. Janszen et al. (1995) arbeiteten für ihre Untersuchungen größere Gewebeproben auf und detektierten somit einen Anstieg der Steroidsulfatase-Aktivität unter der Geburt im Gesamtplazentom.

Wie in der eigenen Arbeit gezeigt wurde, ist in den Rinderplazentomen die Steroidsulfatase fast ausschließlich im Karunkelepithel nachweisbar, wo sie mit dem Östrogenrezeptor α (Schuler et al. 2002) co-lokalisiert ist. Dies unterstützt die Hypothese eines aktiven Sulfatase-Pathways zur Produktion freier Östrogene in diesem Zelltyp. Gleichzeitig kann durch das spezifische, räumliche und zeitliche Expressionsmuster der Steroidsulfatase in den Plazentomen die Wirkung der überwiegend in sulfatierter Form gebildeten, trächtigkeitsassoziierten Östrogene auf ein graviditätsspezifisches Spektrum von Zielzellen begrenzt werden. Diese Zielzellen sind durch die Expression von Steroidsulfatase und Östrogenrezeptoren charakterisiert. Eine toxische, systemische Wirkung der im maternalen Blut vor allem in fortgeschrittenen Graviditätsstadien in hohen Konzentrationen zirkulierenden, plazentaren Östrogene kann hierdurch vermieden werden.

Neben einer Bedeutung in Rahmen des Sulfatase-Pathways zur Erzeugung hoher, lokaler Konzentrationen freier Östrogene im Karunkelepithel ergeben sich aus den eigenen Untersuchungen aber auch Hinweise auf weitere mögliche Funktionen der Steroidsulfatase im Karunkelepithel:

1) Auch in der Humanplazenta ist eine Steroidsulfatase-Expression vorhanden. Im Gegensatz zum Rind ist sie dort allerdings im Syncytiotrophoblasten, also im fetalen Kompartiment lokalisiert, wo sie eine essentielle Rolle bei der Produktion schwangerschaftsassoziierter Östrogene spielt (Dibbelt et al. 1989; Salido et al. 1990) (s. Kap. 2.8.1). Aufgrund des Fehlens einer plazentaren 17 α -Hydroxylase-C17,20-lyase-Aktivität können in der Humanplazenta C₂₁-Prekursoren nicht in nennenswertem Umfang in C₁₉-Steroide umgewandelt werden. Daher ist die Humanplazenta hinsichtlich ihrer Östrogensynthese auf exogene C₁₉-Prekursoren angewiesen, die von der maternalen bzw. fetalen Nebennierenrinde in sulfatierter Form zur Verfügung gestellt werden. Die gegenseitige Abhängigkeit von Fetus und Plazenta bei der Synthese schwangerschaftsassoziierter Östrogene wird durch den Begriff "feto-maternale Einheit" charakterisiert (Diczfalusy et al. 1965; Diczfalusy 1969; Kuss 1994; Shemesh et al. 1997). Im Gegensatz zum Menschen können in der Plazenta des Rindes alle zur Bildung von Östrogenen aus Cholesterin erforderlichen Enzyme nachgewiesen werden (Evans und Wagner 1981, Gross und Williams 1988, Ben-David et al. 1990, Conley et al. 1997, Schuler et al. 1994, Tsumagari et al. 1994, Pescador et al. 1996; Özalp 2005; Schuler et al. 2006; Verduzco Gomez et al. 2007). Allerdings ist der Beginn der steroidogenen Enzymkaskade in der Rinderplazenta bisher noch kaum charakterisiert. Möglicherweise stellen sulfatierte C₂₁-Steroide wie Pregnenolonsulfat oder Cholesterinsulfat aus dem maternalen Kompartiment quantitativ bedeutsame Substrate der plazentaren Steroidsynthese beim Rind dar, die durch die Steroidsulfatase des Karunkelepithels für die weiteren Umwandlungsschritte im Trophoblasten verfügbar gemacht werden. Hierfür spricht, dass weitere initiale Faktoren der Steroidsynthese, nämlich StAR und das P450 side-chain cleaving enzyme, ebenfalls im Karunkelepithel bzw. der Karunkel nachgewiesen wurden (Shemesh et al. 1992; Takagi 2007). Im Einklang mit dieser Hypothese konnte in den eigenen Untersuchungen zur Substratspezifität gezeigt werden, dass die Aktivität der bovinen Steroidsulfatase nicht auf die Sulfate phenolischer Steroide begrenzt ist, sondern dass auch die Sulfate neutraler Steroide wie Pregnenolon und DHEA ähnlich effektiv hydrolysiert werden.

2) Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Rind die Steroidsulfatase-Expression nicht auf die Plazenta beschränkt ist. Auch in anderen steroidogenen Organen wie Hoden, Ovar und Nebennierenrinde war eine deutliche Steroidsulfatase-Expression nach-

weisbar, wo sie ebenfalls eine Rolle in der Verwertung sulfatierter Prekursoren der Steroidsynthese spielen könnte. Die höchsten Konzentrationen Steroidsulfatase-spezifischer mRNA wurden allerdings in Organen gemessen, in denen keine quantitativ bedeutsamen Mengen an endokrin aktiven Steroiden gebildet werden, nämlich in der Haut und der Leber. Auch in Colon und Dünndarm wurden relativ hohe Werte gemessen. Darüber hinaus wurde in zahlreichen anderen untersuchten Geweben eine – wenn auch vergleichsweise niedrige – Steroidsulfatase-Expression nachgewiesen. Dies weist darauf hin, dass die Steroidsulfatase auch Funktionen unabhängig von der Synthese von Steroidhormonen bzw. der Aktivierung von konjugierten Östrogenen besitzt. Entsprechend wurden beim angeborenen Steroidsulfatasemangel des Menschen charakteristische Hautveränderungen beobachtet

(X-linked Ichthyosis). Diese werden darauf zurückgeführt, dass in der Epidermis Cholesterinsulfat eine wichtige Rolle als interzelluläre Kittsubstanz spielt und im Falle eines Steroidsulfatasemangels oder –defekts die normale Abschilferung der oberen Hautschichten beeinträchtigt ist (Ballabio 1995). Möglicherweise ist die Steroidsulfatase auch in der Karunkel des Rindes an der Abschilferung apoptotischer Karunkel epithelzellen beteiligt, denn das Karunkel epithel verfügt offensichtlich über einen hohen Zellumsatz (Hoffmann and Schuler 2002; Boos et al. 2003). Auch beim Rind tritt in sehr seltenen Fällen eine Ichthyosis bei Neugeborenen auf (Dahme und Weiss 1999). Diese wird jedoch nicht geschlechtsgebunden vererbt, so dass ein Bezug zur X-linked Ichthyosis beim Menschen unwahrscheinlich ist. Es ist aber denkbar, dass von einem Steroidsulfatasemangel betroffene, männliche Rinderfeten bereits in einem frühen Trächtigkeitsstadium absterben.

Zusätzlich zur Expression in den Karunkel epithelzellen wurde auch eine mäßige Steroidsulfatase-Expression in einigen Trophoblastriesenzellen gefunden. Zwar waren auch vereinzelt schwache, unspezifische Reaktionen in den Trophoblastriesenzellen der Negativkontrolle sichtbar. Diese unterschieden sich jedoch deutlich von den als spezifisch eingestuften Reaktionen in den Trophoblastriesenzellen durch eine wesentlich schwächere Signalintensität. Ein weiterer wesentlicher Unterschied bestand darin, dass die bei der Verwendung des spezifischen Primärantikörpers in den Trophoblastriesenzellen zu beobachtenden Signale auf die von Steroidsulfatase-positivem Karunkel epithel umgebenen Trophoblastbereiche beschränkt waren. Die in der Negativkontrolle auftretenden, unspezifischen Signale waren dagegen unabhängig von der Steroidsulfatase-Expression in den benachbarten Karunkel epithelzellen anzutreffen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus Messungen der Steroidsulfatase-Aktivität in Kotyledonen, wo ebenfalls eine – wenn auch deutlich niedrigere - Hydrolyse von Estronsulfat festgestellt wurde (Hoffmann et al. 2001a).

Die Funktion der Steroidsulfatase in diesen Trophoblastriesenzellen ist unklar. Die Trophoblastriesenzellen verfügen über den Östrogenrezeptor β und müssen daher als östrogensensitiv betrachtet werden (Schuler et al. 2005). Gleichzeitig sind sie aber auch der Ort, wo die Umwandlung von Androgenen in Östrogene vollzogen wird (Schuler et al. 2006) und die zunächst freien Östrogene sulfatiert werden (Brown et al. 1987). Denkbar ist, dass in den östrogenresponsiven Trophoblastriesenzellen durch die Co-Expression von Steroidsulfatase, Östrogensulfotransferase und Aromatase die Feinregulation des intrazellulären Verhältnisses von freien zu konjugierten Östrogen bewerkstelligt wird.

5.3 Diskussion der Ergebnisse zum bovinen Soat

5.3.1 Organisation des Soat-Gens und Bildung von Soat-Isoformen

Die Variante 1 des bovinen Soats weist, sowohl in der Organisation der mRNA als auch in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz, eine hohe Homologie zu dem humanen SOAT auf. Die beim humanen Soat beschriebene Fähigkeit zum natriumabhängigen Import von DHEA-Sulfat, Estronsulfat und Pregnenolonsulfat konnte für den Soat des Rindes bestätigt werden. Im Gegensatz zum Rind wurden bis jetzt noch bei keiner der anderen bisher untersuchten Spezies Splicevarianten des Soats beschrieben. Bisher ist unklar, welche der beim Rind auf mRNA-Ebene identifizierten und charakterisierten Isoformen auch auf Proteinebene exprimiert werden. Übersetzt man die erarbeiteten Nukleotidsequenzen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen und analysiert diese mit Hilfe entsprechender Software zur Vorhersage von Transmembrandomänen und dreidimensionalen Strukturen, so unterschieden sich die Varianten zum Teil deutlich voneinander. Bei der Wahl des Modells für die Variante 1 wurden die Erkenntnisse von Geyer et al. (2007) für den humanen SOAT berücksichtigt, nach denen sich der N-Terminus des humanen Transporters extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befinden. Daher sprachen sie sich beim humanen Soat für ein 7- oder 9-Transmembrandomänenmodell aus. Aufgrund der starken Homologie der menschlichen Soat-Nukleotidsequenz und der bovinen Variante 1 wurde deshalb dieses Modell auch beim Rind favorisiert, obwohl die Mehrzahl der Programme wie beim Menschen ein 8-Transmembrandomänenmodell präsentierten. Entsprechend wurde auch für die Modellerstellung der anderen Varianten das Programm TopPred2 mit der Kyte Doolittle Scale weiterverwendet, welches das bevorzugte Modell der Variante 1 lieferte. Dabei erscheint besonders die Variante 3 interessant, da ihr Modell dem der Variante 1 stark ähnelt, nur dass ihr die Transmembrandomänen 3-6 fehlen. Eine gleichartige Deletion bei dem strukturell eng mit dem So-

at verwandten apical sodium-dependent bile acid transporter (Asbt) führt dort zu einer Umkehr der Transportrichtung (Lazaridis et al. 2000). Dies ist auch für die bovine Soat-Variante 3 vorstellbar. Es ist möglich, dass eine oder mehrere der weiteren gefundenen Varianten keine Transportfunktion besitzen. Gründe dafür können darin liegen, dass sie nicht in die Membran eingebaut werden können oder ihnen die Strukturen zur Bindung und Transport ihrer Substrate fehlen. Daher könnten sie funktionslos sein oder andere Aufgaben erfüllen oder ein verändertes Substratspektrum aufweisen. Dass es sich bei den gefundenen Varianten um Artefakte bzw. Polymerasefehlern in der RT-PCR handelt ist unwahrscheinlich, da sich identische Veränderungen aus den Plazentomen verschiedener Rinder isolieren ließen und die in Kap. 4.2.2 beschriebenen Abweichungen der Varianten 2-5 in der Nukleotidsequenz von der bovinen Variante 1 bzw. der etablierten Sequenz des Menschen immer in Verbindung mit Exon-Intron-Grenzen auftraten, was für Insertionen bzw. Deletionen spricht. Auf eine weitere mögliche Bestätigung wie zum Beispiel mittels Northern Blot wurde daher verzichtet.

5.3.2 Diskussion der Soat-Expression in den Rinderplazentomen und weiteren Geweben

Die mittels Real-Time RT-PCR gemessene Soat-Expression ist zu allen untersuchten Trächtigkeitszeitpunkten in den Karunkeln deutlich höher als in den Kotyledonen ($p < 0,0001$). Unklar bleibt, ob die in den Kotyledonen gemessenen niedrigen Expressionswerte tatsächlich auf einer schwachen Expression im fetalen Kompartiment der Plazentome beruhen oder ob sie auf geringfügige Kontaminationen des präparierten Kotyledonengewebes mit Gewebe karunkulärem Ursprunges zurückzuführen ist. In den Karunkeln ist darüber hinaus ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der relativen Genexpression ab dem 3. Trimester der Gravidität, über den Eintritt der präpartalen Luteolyse bis hin zur Geburt zu beobachten. Wie oben dargelegt, wird in den Plazentomen des Rindes der Soat überwiegend oder ausschließlich im maternalen Teil exprimiert. Über die Soat-Lokalisation in den Karunkeln auf zellulärer Ebene liegen derzeit keine gesicherten Informationen vor. Der Nachweis der Soat-mRNA in einer reinen Karunkel-epithelzellkultur spricht jedoch dafür, dass in diesem Zelltyp eine Co-Expression von Soat und Steroidsulfatase stattfindet. Somit ergibt sich dort die Möglichkeit einer funktionellen Kopplung: Aufnahme sulfatierter Steroide via Soat und Einschleusen der aufgenommenen Steroidsulfate in den Sulfatase-Pathway (Östrogene) bzw. in die Steroidsynthese (neutrale Steroide) nach Hydrolyse durch die Steroidsulfatase. Neben der Messung des Expressionsverlaufs der Soat-mRNA in Plazentomen im Verlaufe der Gravidität wurden mittels des etablier-

ten Real-Time RT-PCR Verfahrens die relative Genexpression in verschiedenen anderen Organen des Rindes untersucht. Hierbei ergaben sich deutliche Parallelen zu den von Geyer et al. (2007) beim Menschen publizierten Resultaten. Die höchste relative Genexpression wurde bei beiden Spezies im Hoden gemessen. Nebennierenrinde und Haut zeigten beim Rind ebenfalls eine relative hohe Expression. Beim Menschen existieren hierzu noch keine Daten. Des Weiteren wurde bei beiden Spezies eine deutliche Soat-Expression in Leber, Dünndarm, Ovar, Nebenniere, Milchdrüse und Plazenta festgestellt. Es fällt auf, dass neben der Plazenta andere klassische steroidogene Organe wie Nebennierenrinde, Ovar und Hoden eine mäßige bis hohe Soat-Expression aufweisen. Dies passt zu der Theorie, dass der Soat in diesen Organen sulfatierte Steroide in die Zellen einschleust und dort für die Verwendung in der Steroidsynthese verfügbar macht.

Während der Gravidität des Rindes treten erhebliche Mengen an Estronsulfat aus den Trophoblastriesenzellen in den maternalen Kreislauf über. Sieht man von der Möglichkeit eines vorwiegenden parazellulären Transports ab, so müsste hierbei Estronsulfat nicht nur in verschiedene Zelltypen aufgenommen, sondern auch wieder ausgeschleust werden. Hierbei könnte, wie oben dargestellt, der Variante 3 des bovinen Soats eine wichtige Rolle zukommen. Für den Austritt von Estronsulfat aus den Trophoblastriesenzellen erscheint allerdings kein spezieller Exportmechanismus erforderlich zu sein, da diese nach Invasion ins Karunkelepithel degranulieren bzw. apoptotisch zugrunde gehen und auf diese Weise nicht membrangängige Moleküle ins maternale Kompartiment abgeben können (Wooding und Wathes 1980, Wooding 1982, Wooding 1983).

5.4 Schlussfolgerungen

Die Bedeutung der plazentaren Steroidbiosynthese beim Rind ist derzeit immer noch unklar. Wesentliche Grundlage für das Verständnis dieses Phänomens sind die Lokalisation der beteiligten Enzyme auf zellulärer Ebene und die Charakterisierung ihrer Expression im Verlauf der Gravidität sowie unter der Geburt. Mit der umfassenden Charakterisierung der Steroidsulfatase-Expression in den Rinderplazentomen konnte diesbezüglich eine erhebliche Wissenslücke geschlossen werden. Die Zuordnung der Steroidsulfatase-Expression zu den östrogenrezeptorpositiven Karunkelepithelzellen steht prinzipiell im Einklang mit der Hypothese eines Sulfatase-Pathways zur lokalen Erzeugung freier, aktiver Östrogene bei gleichzeitigem Schutz des Muttertieres vor unerwünschten systemischen Nebenwirkungen der in außerordentlich hohen Mengen gebildeten trächtigkeitsassoziierten Östrogene. Die Ergebnisse der Steroidsul-

fatase-Expression lassen jedoch insbesondere in Verbindung mit dem Expressionsmuster weiterer steroidogener Enzyme, dem Substratspektrum der Steroidsulfatase und ihrem Nachweis in zahlreichen anderen Organen auch andere funktionelle Schlussfolgerungen zu. Dies gilt besonders im Hinblick auf eine Bedeutung der Steroidsulfatase für die Einschleusung sulfatierter C_{21} -Prekursoren bzw. von Cholesterinsulfat aus dem maternalen Kompartiment in die Steroidsynthese des Trophoblasten. Hier sind zu einer Abklärung weitere, insbesondere auch tierexperimentelle Untersuchungen erforderlich.

Obwohl aufgrund ihrer polaren Eigenschaften für Steroidsulfate bereits seit längerem die Existenz spezieller Transportmechanismen durch biologische Membranen postuliert wird, lagen bisher keine konkreten Informationen hierzu vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der vor kurzem beim Menschen und der Ratte identifizierte und charakterisierte Natrium-dependent Organic Anion Transporter (Soat) auch beim Rind effektiv den Import sulfatierter neutraler und phenolischer Steroide vermittelt. Somit kommt er als wichtiger Transporter der während der Gravidität des Rindes in hohen Konzentrationen gebildeten, konjugierten Östrogene in Frage. In den Rinderplazentomen ist der Soat wie die Steroidsulfatase in den Karunkeln lokalisiert. Die Untersuchung zur Expression beider Faktoren deutet darauf hin, dass diese im unmittelbaren präpartalen Zeitraum in ähnlicher Weise aufreguliert werden. Daher liegt im Karunkelepithel möglicherweise eine funktionelle Kopplung von Soat und Steroidsulfatase vor, wobei die sulfatierten Substrate der intrazellulären Steroidsulfatase über den Soat in die Zelle aufgenommen werden können. Wie für die Steroidsulfatase sind auch bezüglich des Soats weitere Untersuchungen zur biologischen Bedeutung erforderlich, insbesondere ob es sich in vivo bei den physiologischen Substraten dieses Transporters um konjugierte Östrogene aus dem Trophoblasten oder sulfatierte neutrale Steroide aus dem maternalen Kompartiment handelt.

6 Zusammenfassung

Die Rinderplazenta produziert während der Trächtigkeit erhebliche Mengen an Östrogenen. Mit Ausnahme der letzten beiden Wochen der Trächtigkeit werden diese zum überwiegenden Teil in Form von Estronsulfat (E1S) aus dem Trophoblasten freigesetzt. Die funktionelle Bedeutung der plazentaren Östrogensynthese des Rindes ist weitgehend unklar, da Estronsulfat nicht mit den klassischen nukleären Östrogenrezeptoren interagiert. Unter der Einwirkung einer Steroidsulfatase (StS) können sulfatierte Östrogene jedoch in freie, rezeptoraktive Östrogene überführt werden ("Sulfatase Pathway" zur Produktion freier Östrogene). In vorangegangenen Arbeiten an Gewebehomogenaten konnten in den Plazentomen und dort v.a. in den Karunkeln hohe Steroidsulfatase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Weiterhin fand sich in den Karunkeln, insbesondere in den Karunkelepithelzellen, eine hohe Östrogenrezeptor-Expression. Diese Befunde sprechen dafür, dass die plazentaren Östrogene vorwiegend als lokale Regulatoren von Wachstum, Differenzierung und Funktionen der Karunkeln fungieren. Ihre Wirkung wäre dabei weitgehend auf ein limitiertes Spektrum potentiell östrogenresponder Zielzellen begrenzt, die neben einem Östrogenrezeptor auch eine Steroidsulfatase exprimieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit die bovine Steroidsulfatase kloniert, auf molekularer Ebene charakterisiert und ihre Expression in den Rinderplazentomen im Verlauf der Gravidität erfasst werden.

Immunhistologisch wurde die Steroidsulfatase unter Verwendung eines gegen das homologe menschliche Enzym gerichteten Antiserums in den Rinderplazentomen vorwiegend in den Karunkelepithelzellen lokalisiert, wo ihr Expressionsmuster eine deutliche Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium zeigte. Zwischen dem 100.-240. Trächtigkeitstag waren die Signale überwiegend von schwacher bis mäßiger Intensität und weitgehend auf die Bereiche des Karunkelepithels beschränkt, die an die Chorionplatte und die chorionplattennahen Primär- und Sekundärzotten grenzten. In der späten Gravidität breitete sich das Signal im Karunkelepithel zunehmend entlang der Sekundär- und Tertiärzotten und in Richtung des Karunkelstiels aus. Nach Einsetzen der präpartalen Luteolyse war in allen Teilen des Karunkelepithels ein nahezu homogenes, moderates bis intensives Signal vorhanden. Zusätzlich zu den Signalen im Karunkelepithel war gelegentlich auch das Zytoplasma einzelner Trophoblastriesenzellen gefärbt.

Der Open Reading Frame der bovinen Steroidsulfatase wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von Homologieprimern und RACE-PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Analyse der Exon-Intron-Struktur sowie der Nukleotid- und Aminosäuresequenz ergab eine

hohe Homologie zwischen der humanen und dem bovinen Steroidsulfatase (77% auf Aminosäureebene). Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Open Reading Frame der bovinen Steroidsulfatase zeigten diese eine ausgeprägte Hydrolyse von Pregnenolonsulfat und Estronsulfat. Mittels Real-Time RT-PCR wurde die relative Expressionsstärke in den Plazentomen zwischen dem 100. Trächtigkeitstag und der Geburt gemessen. In den Plazentomen zeigte sich in der präpartalen Phase im Vergleich zum zweiten und dritten Trimester der Trächtigkeit ein mäßiger Anstieg um den Faktor 2.7, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Mittels des etablierten Real-Time RT-PCR-Verfahrens wurde zu Vergleichszwecken auch die Steroidsulfatase-mRNA-Konzentration in verschiedenen anderen Rinderorganen gemessen. Neben der Plazenta war eine deutliche Steroidsulfatase-Expression in weiteren steroidogenen Organen (Ovar, Hoden, Nebennierenrinde) nachweisbar. Unter den untersuchten Organen wurde die höchste Expression jedoch in Haut und Leber gemessen.

Die Zuordnung der Steroidsulfatase-Expression zu den Östrogenrezeptor-positiven Karunkelepithelzellen steht prinzipiell im Einklang mit der Hypothese eines Sulfatase-Pathways zur lokalen Erzeugung freier, aktiver Östrogene bei gleichzeitigem Schutz des Muttertieres vor unerwünschten, systemischen Nebenwirkungen der in außerordentlich hohen Mengen gebildeten trächtigkeitsassoziierten Östrogene. Die zur Steroidsulfatase-Expression erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch insbesondere in Verbindung mit den Expressionsmustern weiterer steroidogener Enzyme in den Plazentomen, dem Substratspektrum der Steroidsulfatase und ihrem Nachweis in zahlreichen weiteren Organen ohne quantitativ bedeutsamen Steroidmetabolismus auch andere funktionelle Schlussfolgerungen zu. Dazu zählt besonders eine Bedeutung der Steroidsulfatase für die Einschleusung sulfatierter neutraler Steroide (z.B. Pregnenolonsulfat oder Cholesterinsulfat) aus dem maternalen Kompartiment in die Steroidsynthese des Trophoblasten.

Weiterer Gegenstand dieser Arbeit war der Transport sulfatierter Steroide in den Rinderplazentomen. Im Gegensatz zu freien Steroiden, welche aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften biologische Membranen durch Diffusion überwinden können, liegen zum zellulären Im- bzw. Export der weitaus polareren Steroidsulfate bisher kaum Informationen vor. Für den erst kürzlich bei Mensch und Ratte klonierten Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT) war gezeigt worden, dass er *in vitro* effektiv die zelluläre Aufnahme von Estronsulfat vermittelt. Daher wurde der bovine Soat aus der Rinderplazenta mittels Primer Walking unter Verwendung eines bereits zuvor bekannten, kurzen Fragments und von Rinder genomdaten kloniert und dessen Expression in den Plazentomen im Verlauf der Trächtigkeit und unter der Geburt charakterisiert. Die bovine Soat-mRNA wies im Vergleich zum menschlichen Soat ei-

ne identische Intron-Exon-Struktur auf. Das bovine Gen ist ebenfalls aus sechs Exonen zusammengesetzt. Die Homologie auf Proteinebene betrug 78%. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Spezies konnten beim Rind auf mRNA-Ebene neben dem Standard-Soat (Variante 1) vier weitere Varianten identifiziert werden, die durch Deletionen von einem oder mehreren Exonen und/oder Insertion eines zusätzlichen Exons gebildet werden. Variante 2 entsteht durch Deletion des Exons 4, die zu einem Rasterschub führt. Dadurch verändern sich die von Exon 5 und 6 kodierten Aminosäuren und es kommt zu einem vorzeitigen Stopcodon. Das Protein der Variante 2 ist statt 319 Aminosäuren nur noch 240 Aminosäuren lang. Variante 3 beinhaltet Deletionen der Exons 2-4 ohne Veränderung des Leserasters. Dem Protein fehlen gegenüber Variante 1 128 Aminosäuren, die Aminosäuren-Abfolge am N- bzw. C-Terminus bleibt jedoch erhalten. Die Varianten 4 und 5 zeichnen sich durch die Insertion eines zusätzlichen Exons 1' aus. Variante 4 hat zusätzlich noch eine Deletion des Exons 4, dies wirkt sich auf der Proteinebene aber nicht aus, da Exon 1' mehrere Stopcodons enthält. Zur quantitativen Erfassung der Soat-Expression in den Karunkeln bzw. Kotyledonen wurde ein Real-Time RT-PCR-Verfahren etabliert, das alle identifizierten Varianten gemeinsam erfasste. Die gemessene Genexpression war im maternalen Teil der Plazentome signifikant höher als im fetalen ($p < 0,0001$). Während in den Kotyledonen zwischen dem 100. Trächtigkeitstag und der Geburt die Messwerte auf sehr niedrigem Niveau relativ konstant blieben, war in den Karunkeln ein statistisch nicht signifikanter Anstieg in der unmittelbaren präpartalen Phase sowie unter der Geburt zu beobachten. Mittels des etablierten Real-Time RT-PCR-Verfahrens wurde zu Vergleichszwecken auch die Soat-mRNA-Konzentration in verschiedenen anderen Rinderorganen gemessen. Die höchsten Expressionen wurden in den Hoden, der Haut und in der Nebennierenrinde nachgewiesen. Eine deutliche Expression war neben der Plazenta auch in Leber, Pansen, Dünndarm, Lymphknoten, Euter und Ovar zu finden. In einer reinen Karunkel-epithelzellkultur konnte ebenfalls Soat-mRNA nachgewiesen werden. Durch Experimente mit transient transfizierten HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Soat-Variante 1 des Rindes natriumabhängig sehr effektiv die zelluläre Aufnahme von Dehydroepiandrosteronsulfat, Pregnenolonsulfat und Estronsulfat vermittelt. Die Funktion der Varianten 2-5 wurde bisher noch nicht untersucht. Denkbar ist, dass sie eine verändertes Substratspektrum und/oder Substrataffinität besitzen, funktionslos sind oder aber die Transportrichtung umkehren, wie dies für eine Deletionsvariante des nahe verwandten Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporters (Asbt) beschrieben wurde.

Die zum bovinen Soat erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass dieser ein physiologisch relevanter Steroidsulfattransporter ist, der eine bedeutende Rolle beim Transport graviditätsas-

soziierter, sulfatierter Steroide spielen könnte. Die Co-lokalisierung von Soat und Steroidsulfatase und deren ähnliche Expressionsmuster in den Karunkeln des Rindes deuten darauf hin, dass dort beide ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegen und funktionell kooperieren könnten.

7 Summary

During gestation the bovine placenta produces high amounts of estrogens. With the exception of the last two weeks of pregnancy, they are almost exclusively released by the trophoblast as estrone sulfate (E1S). As estrone sulfate does not bind to classic nuclear estrogen receptors, the biological role of bovine pregnancy-associated estrogens are widely unclear. However, sulfated estrogens may be hydrolysed by the activity of a steroid sulfatase (StS) providing free active estrogens ("sulfatase pathway" for the production of free estrogens). In preceding experiments using tissue homogenates high steroid sulfatase activities were found in the bovine placentomes, mainly in the maternal part. Furthermore, a high estrogen receptor expression was found in the caruncle, especially in caruncular epithelial cells. These findings suggest that placental estrogen sulfates act primarily as local regulators of caruncular growth, differentiation and functions. The predominant production of sulfated estrogens could serve the restriction of their effects to a limited spectrum among the potential estrogen-responsive target cells, which are characterized by steroid sulfatase expression thereby avoiding detrimental systemic side effects. To verify this hypothesis, bovine steroid sulfatase was cloned and its expression was monitored in bovine placentomes in the course of pregnancy.

Using an antiserum against the homologous human enzyme, bovine steroid sulfatase was detected immunohistochemically almost exclusively in caruncular epithelial cells. Its expression pattern was clearly related to gestational age. Between day 100 and 240 of pregnancy the signals were mostly of low to moderate intensity and more or less limited to the caruncular epithelium adjacent to the chorionic plate and basal parts of primary and secondary chorionic villi. In late gestation the signal spread gradually along secondary and tertiary villi towards the caruncular stalk. After the onset of the prepartal luteolysis an almost homogeneous, moderate to intense signal occurred in all parts of the caruncular epithelium. In addition to caruncular epithelial cells, cytoplasmic staining was found in a minor fraction of trophoblast giant cells.

To characterize bovine steroid sulfatase on a molecular level, the open reading frame of bovine steroid sulfatase was cloned using homology primers, RT-PCR and RACE-PCR. The analysis of the exon-intron-structure and of the nucleotid and amino acid sequence showed a high homology between the human and the bovine enzyme (77 % on the level of amino acid). After transient transfection with the bovine steroid sulfatase open reading frame HEK293 cells showed a significant hydrolysis of pregnenolone sulfate and estrone sulfate. A Real-

Time RT-PCR method specific to bovine steroid sulfatase was established and its mRNA levels in placentomes were measured between day 100 of pregnancy and parturition. Around the time of prepartal luteolysis and at parturition, a moderate 2.7-fold increase of steroid sulfatase-mRNA expression was observed compared to the preceding period of gestation. However, this increase was not statistically significant. For comparison, steroid sulfatase-mRNA levels were also measured in various bovine organs. High expression levels were found in other steroidogenic organs such as ovary, testis and adrenal gland. However, among the organs investigated, highest expression levels were measured in skin and liver. The co-localisation of the steroid sulfatase expression in the estrogen receptor-positive caruncular epithelial cells is consistent with the existence of a sulfatase-pathway for the local production of free, active estrogens in the bovine caruncle by which the mother would be protected from detrimental systemic side-effects by placental estrogens circulating in extraordinarily high concentrations in the maternal compartment. On the other hand, considering steroid sulfatase expression patterns on a cellular level, the substrate spectrum of bovine steroid sulfatase, the detection of this enzyme in various other organs without a quantitatively significant production of hormonally active steroids and the expression pattern of other steroidogenic enzymes, other possible functions of bovine placental steroid sulfatase must also be taken into account. Especially a role of steroid sulfatase in the utilization of sulfoconjugated neutral steroid precursors (e.g. cholesterol sulfate or pregnenolone sulfate) extracted from maternal must be considered, which may be an important way to provide free steroid substrates to the trophoblast.

A further subject of this dissertation was the transport of sulfoconjugated steroids. Other than free steroids, which are able to penetrate biological membranes passively by diffusion due to their lipophilic properties, the transmembrane passage of the significantly more polar sulfated steroids depends putatively on specific transport mechanisms, which have not been definitely identified yet. However, the Sodium-dependent Anionic Transporter (SOAT) recently cloned in humans and rats has been shown to efficiently mediate the cellular import of estrone sulfate *in vitro*. Thus the bovine SOAT-mRNA was cloned from placentomes by RT-PCR and primer walking using data from a previously cloned small fragment and information from the bovine genome. It showed an identical intron-extron-structure compared to the human SOAT. It is also composed of six exons. The homology on the protein level was 78%. Contrary to the SOAT in other species examined so far, in the cow four variants occurred on the mRNA level in addition to the standard SOAT (variant 1). The variants are formed by the deletion of complete exons and/or the insertion of an additional exon. In variant 2 exon 4 is deleted,

which causes a frame shift. This results in a premature stop codon and the corresponding protein is predicted to contain only 240 instead of 319 amino acids. In variant 3 exons 2-4 are deleted without a change in the reading frame. The predicted protein is missing 128 amino acids in comparison to variant 1. However, the amino acid-sequence at the N- and C-terminus is maintained. Variants 4 and 5 are characterized by the insertion of an additional exon 1'. An additional deletion of exon 4 occurs in variant 4. However, the predicted proteins for exons 4 and 5 are identical as exon 1' includes several stop codons. Based on the sequence information obtained, a Real-Time RT-PCR system specific to bovine SOAT was established which was able to cover all identified variants, and SOAT-mRNA levels were measured in bovine caruncles and cotyledons between day 100 and parturition. SOAT-mRNA levels were significantly higher in the maternal than in the fetal part of the placentomes ($p < 0.0001$). Whereas in the cotyledons they remained on a constant low level in the period under investigation, there was a significant increase in the caruncles around the time of the prepartal luteolysis and at parturition. For comparison, SOAT-mRNA concentrations were also measured in various other bovine organs. Among the organs investigated, the highest expression was found in testis, skin and the adrenal gland. Additionally a strong expression was also found in the liver, rumen, small intestine, lymph node, mammary gland und ovary. SOAT-mRNA was also detected in a pure caruncular epithelial cell line. By transport studies using HEK 293 cells transiently transfected with bovine standard SOAT a significant sodium-dependent cellular import of dehydroepiandrosterone sulfate, pregnenolone sulfate and estrone sulfate was demonstrated. The functions of bovine SOAT variants 2-5 have not been studied so far. Possibly they have a different substrate affinity and/or spectrum, may be functionally inactive or may exhibit an inverted direction of transport, as it has been described for a variant of the closely related apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) similar SOAT-variant 3.

The results obtained for the bovine SOAT suggest that in cattle it is a physiological relevant steroid sulfate transporter, which could play an important role in the transport of pregnancy associated sulfoconjugated steroids. The co-localization of SOAT and steroid sulfatase and their similar expression pattern in the bovine caruncle indicate that they are subject to similar regulatory mechanisms and that they may cooperate functionally.

8 Literaturverzeichnis

Alperin, E. S. und L. J. Shapiro (1997). "Characterization of point mutations in patients with X-linked Ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein." J Biol Chem **272**(33): 20756-20763.

Amoroso, E. C. (1959). "Comparative anatomy of the placenta." Ann N Y Acad Sci **75**: 855-872.

Arakane F., S. R. King, Y. Du, BC. Kallen , P.L. Walsh, H. Watari, MD Stocco and FJ Strauss (1997). "Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (Star) modulates its steroidogenic activity." J Biol Chem **51**: 32656-32662.

Atkinson, B. A., G. J. King und E. C. Amoroso (1984). "Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium." Biol Reprod **30**(3): 763-774.

Ballabio, A. und LJ. Shapiro. (1995). "The metabolic and molecular bases of inherited diseases." McGraw-Hill Inc., New York: 2999-3022.

Basler, E., M. Grompe, G. Parenti, J. Yates und A. Ballabio (1992). "Identification of point mutations in the steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis." Am J Hum Genet **50**(3): 483-491.

Bedin, M., D. Weil, T. Fournier, L. Cedard und J. Frezal (1981). "Biochemical evidence for the non-inactivation of the steroid sulfatase locus in human placenta and fibroblasts." Hum Genet **59**(3): 256-258.

Ben-David, E. und M. Shemesh (1990). "Ultrastructural localization of cytochrome P-450scc in the bovine placentome using protein a-gold technique." Biol Reprod **42**(1): 131-138.

Benedetto, M. T., S. Tabanelli und E. Gurpide (1990). "Estrone sulfate sulfatase activity is increased during in vitro decidualization of stromal cells from human endometrium." J Clin Endocrinol Metab **70**(2): 342-345.

Berkovitz, G. D., M. Fujimoto, T. R. Brown, A. M. Brodie und C. J. Migeon (1984). "Aromatase activity in cultured human genital skin fibroblasts." J Clin Endocrinol Metab **59**(4): 665-671.

Bhavnani, B. R. (1998). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of conjugated equine estrogens: chemistry and metabolism." Proc Soc Exp Biol Med **217**(1): 6-16.

Birgel EH, und E. Grunert (1996). "Untersuchung über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen." Prakt. Tierarzt **77**: 627-630.

Björkman, N. (1954). "Morphological and histochemical studies on the bovine placentome." Acta Anat **22**: 1-99.

- Björkman, N. (1968). "Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome." J. Ultrastructure Research **24**: 249-258.
- Björkman, N. (1969). "Light and electron microscopic studies on cellular alteration in the bovine placentome." Anat. Rec. **163**: 17-30.
- Bleau, G., A. Chapdelaine und K. D. Roberts (1971). "Studies on mammalian and molluscan steroid sulfatase. Solubilization and properties." Can J Biochem **49**(2): 234-242.
- Bonifas, J. M., B. J. Morley, R. E. Oakey, Y. W. Kan und E. H. Epstein, Jr. (1987). "Cloning of a cDNA for steroid sulfatase: Frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X chromosome-linked ichthyosis." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9248-9251.
- Bonser, J., J. Walker, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. Potter, D. S. Willis, S. Franks und H. D. Mason (2000). "Human granulosa cells are a site of sulphatase activity and are able to Utilize dehydroepiandrosterone sulphate as a precursor for oestradiol production." J Endocrinol **167**(3): 465-471.
- Boos, A., J. Kohtes, A. Stelljes, H. Zerbe and H. H. Thole (2000). "Immunohistochemical Assessment of Progesterone, Oestrogen and Glucocorticoid Receptors in Bovine Placentomes During Pregnancy, Induced Parturition, and after Birth with or without Retention of Fetal Membranes." J Reprod Fertil **120**(2): 351-360.
- Boos, A., V. Janssen and C. Mulling (2003). "Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes." Reproduction **126**(4): 469-480.
- Boos, A., J. Kohtes, V. Janssen, C. Mulling, A. Stelljes, H. Zerbe, M. Hassig und H. H. Thole (2006). "Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes." Anim Reprod Sci **91**(1-2): 55-76.
- Brown, J. M., J. B. Adams und C. W. Beattie (1987). "Production and characterization of a monoclonal antibody to bovine estrogen sulfotransferase." Hybridoma **6**(4): 413-422.
- Bukovsky, A., M. R. Caudle, M. Cekanova, R. I. Fernando, J. Wimalasena, J. S. Foster, D. C. Henley und R. F. Elder (2003). "Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant--Comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells." Reprod Biol Endocrinol **1**: 36.
- Burns, G. (1983). "On the identity of arylsulphatase C and steroid sulphatase." Hum Genet **65**(2): 189.
- Carnegie, J. A. und H. A. Robertson (1978). "Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: A possible role for estrone sulfate during early pregnancy." Biol Reprod **19**(1): 202-211.
- Carter, A. M. und A. C. Enders (2004). "Comparative aspects of trophoblast development and placentation." Reprod Biol Endocrinol **2**: 46.

-
- Chaffkin, L. M., A. A. Luciano und J. J. Peluso (1993). "The role of progesterone in regulating human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro." J Clin Endocrinol Metab **76**(3): 696-700.
- Challis, J. R. und E. Greenblatt (1980). "Metabolism of ^3H -oestrone sulphate by fetal membranes, placenta and uterine tissues from pregnant rabbits." J Reprod Fertil **58**(1): 13-18.
- Chance, P. F. und S. M. Gartler (1983). "Evidence for a dosage effect at the X-linked steroid sulfatase locus in human tissues." Am J Hum Genet **35**(2): 234-240.
- Chang, P. L., O. T. Mueller, R. M. Lafrenie, P. A. Varey, N. E. Rosa, R. G. Davidson, W. M. Henry und T. B. Shows (1990). "The human arylsulfatase-C isoenzymes: Two distinct genes that escape from X inactivation." Am J Hum Genet **46**(4): 729-737.
- Chapman, E., M. D. Best, S. R. Hanson und C. H. Wong (2004). "Sulfotransferases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility." Angew Chem Int Ed Engl **43**(27): 3526-3548.
- Chibbar, R. und B. F. Mitchell (1990). "Steroid sulfohydrolase in human chorion and decidua: Studies using pregnenolone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate as substrate." J Clin Endocrinol Metab **70**(6): 1693-1701.
- Compagnone, N. A., E. Salido, L. J. Shapiro und S. H. Mellon (1997). "Expression of steroid sulfatase during embryogenesis." Endocrinology **138**(11): 4768-4773.
- Conary, J. T., G. Lorkowski, B. Schmidt, R. Pohlmann, G. Nagel, H. E. Meyer, C. Krentler, J. Cully, A. Hasilik und K. von Figura (1987). "Genetic heterogeneity of steroid sulfatase deficiency revealed with cDNA for human steroid sulfatase." Biochem Biophys Res Commun **144**(2): 1010-1017.
- Conley, A. J. und I. M. Bird (1997). "The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals." Biol Reprod **56**(4): 789-799.
- Convey, E. M. (1974). "Serum hormone concentrations in ruminants during mammary growth, lactogenesis, and lactation: A Review." J Dairy Sci **57**(8): 905-17.
- Csapo, A.I. und C.A. Pinto-Dantas (1965). "The effect of progesterone in the human uterus." Proc Natl Acad Sci U S A **54**(4):1069-76.
- Dahme, E. und E. Weiss. (1999). "Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere." Enke Verlag, 5. Auflage: 487
- Dancis, J., V. Jansen und J. Hutzler (1983). "Hair root analysis in X-linked ichthyosis." J Inher Metab Dis **6**(4): 173-177.
- Daniel, W. L. und P. L. Chang (1990). "Comparison of arylsulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver." Enzyme **43**(4): 212-222.

David, M., N. Israel, R. Merksamer, N. Bar-Nizan, Z. Borochowitz, H. Bar-el, I. Yehudai und H. Dar (1995). "Very low maternal serum unconjugated estriol and prenatal diagnosis of steroid sulfatase deficiency." Fetal Diagn Ther **10**(2): 76-79.

Day, A. (1977). "Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle." N. Z. Vet. J. **25**: 139-144.

Dibbelt, L. und E. Kuss (1983). "Human placental steroid-sulfatase. Kinetics of the in-vitro hydrolysis of dehydroepiandrosterone 3-sulfate and of 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone 3-sulfate." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **364**(2): 187-191.

Dibbelt, L. und E. Kuss (1984). "Human placental steroid-sulfatase solubilized with a cholic-acid derivative: Molecular mass, kinetic properties and susceptibility to glycosidases." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **365**(9): 1145-53.

Dibbelt, L., V. Herzog und E. Kuss (1989). "Human placental steryl-sulfatase: Immunocytochemical and biochemical localization." Biol Chem Hoppe Seyler **370**(10): 1093-1102.

Dibbelt, L. und E. Kuss (1991). "Human placental steryl-sulfatase. Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and Anion transport inhibitors." Biol Chem Hoppe Seyler **372**(3): 173-185.

Diczfalusy, E. (1964). "Endocrine functions of the human fetoplacental unit." Fed Proc **23**: 791-198.

Diczfalusy, E. (1969). "Steroid metabolism in the human foeto-placental unit." Acta Endocrinol (Copenh) **61**(4): 649-664.

Diczfalusy, E., R. Pion und J. Schwers (1965). "Steroid Biogenesis and Metabolism in the Human Foeto-Placental Unit at Midpregnancy." Arch Anat Microsc Morphol Exp **54**: 67-83.

Dijkstra, A. C., A. M. Vermeesch-Markslag, E. W. Vromans, R. Happle, P. C. van de Kerkhof, B. Zwanenburg, F. Vos und A. J. Vermorken (1987). "Substrate specific sulfatase activity from hair follicles in recessive X-linked ichthyosis." Acta Derm Venereol **67**(5): 369-376.

Dolly, J. O., K. S. Dodgson und F. A. Rose (1972). "Studies on the oestrogen sulphatase and arylsulphatase C activities of rat liver." Biochem J **128**(2): 337-345.

Duello, T. M., J. C. Byatt und R. D. Bremel (1986). "Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes." Endocrinology **119**(3): 1351-1355.

Dwyer, R. J. und H. A. Robertson (1980). "Oestrogen sulphatase and sulphotransferase activities in the endometrium of the sow and ewe during pregnancy." J Reprod Fertil **60**(1): 187-191.

Edery, M., J. Goussard, L. Dehennin, R. Scholler, J. Reiffsteck und M. A. Drosowsky (1981). "Endogenous oestradiol-17beta concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radioimmunoassay: Relationship to receptor content." Eur J Cancer **17**(1): 115-120.

-
- Eissa, H. M. und M. S. el-Belely (1990). "Sequential changes in plasma progesterone, total oestrogens and corticosteroids in cow throughout pregnancy and around parturition." Arch Exp Veterinarmed **44**(4): 639-644.
- Eley, R. M., W. W. Thatcher und F. W. Bazer (1979). "Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development." J Reprod Fertil **55**(1): 181-190.
- Eneman, J. D., M. E. Wood und H. B. Muss (2004). "Selecting adjuvant endocrine therapy for breast cancer." Oncology (Williston Park) **18**(14): 1733-44, discussion 1744-1745, 1748, 1751-1754.
- Epstein, E. H., Jr. und M. E. Leventhal (1981). "Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermis and the diagnosis of recessive X-linked ichthyosis." J Clin Invest **67**(5): 1257-1262.
- Estergreen VL, F. O., Gomes WR, Erb RE und Bullard JF (1967). "Effect of ovariectomy on pregnancy maintaince and parturation in dairy cows." J. Dairy Sci. **50**: 1293-1295.
- Evans, G. und W. C. Wagner (1981). "In vitro oestrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition." Acta Endocrinol (Copenh) **98**(1): 119-125.
- Evans, T. R., M. G. Rowlands, M. Jarman und R. C. Coombes (1991). "Inhibition of estrone sulfatase enzyme in human placenta and human breast carcinoma." J Steroid Biochem Mol Biol **39**(4A): 493-499.
- Evans, T. R., M. G. Rowlands, S. S. Sahota und R. C. Coombes (1994). "Lack of inhibition of placental estrone sulfatase and aromatase enzymes by vitamin D3 and its analogs." J Steroid Biochem Mol Biol **48**(5-6): 563-566.
- Falany, C. N. (1997). "Enzymology of human cytosolic sulfotransferases." Faseb J **11**(4): 206-216.
- Falter, K. (1999). "In vitro Untersuchung zur Bildung und Metabolisierung konjugierter Östrogene in der Rinderplazenta während der Gravidität und unter der Geburt." Dissertation vet. med. JLU Giessen.
- Flood, J. F., S. A. Farr, D. A. Johnson, P. K. Li und J. E. Morley (1999). "Peripheral steroid sulfatase inhibition potentiates improvement of memory retention for hippocampally administered dehydroepiandrosterone sulfate but not pregnenolone sulfate." Psychoneuroendocrinology **24**(8): 799-811.
- Foster, P. A., S. P. Newman, S. K. Chander, C. Stengel, R. Jhalli, L. L. Woo, B. V. Potter, M. J. Reed und A. Purohit (2006). "In vivo efficacy of Stx213, a second-generation steroid sulfatase inhibitor, for hormone-dependent breast cancer therapy." Clin Cancer Res **12**(18): 5543-5549.
- Foster, P. A., S. K. Chander, M. F. Parsons, S. P. Newman, L. W. Woo, B. V. Potter, M. J. Reed und A. Purohit (2007). "Efficacy of three potent steroid sulfatase inhibitors: Pre-clinical investigations for their use in the treatment of hormone-dependent breast cancer." Breast Cancer Res Treat.

Gamage, N., A. Barnett, N. Hempel, R. G. Duggleby, K. F. Windmill, J. L. Martin und M. E. McManus (2006). "Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism." Toxicol Sci **90**(1): 5-22.

Geyer, J., B. Döring, K. Failing und E. Petzinger (2004). "Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal." Biochem Biophys Res Commun. **316**(2): 300-306.

Geyer, J., T. Wilke und E. Petzinger (2006). "The solute carrier family Slc10: More than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **372**(6): 413-431.

Geyer, J., B. Döring, K. Meerkamp, B. Ugele, N. Bakhiya, C. F. Fernandes, J. R. Godoy, H. Glatt und E. Petzinger (2007). "Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (Slc10a6)." J Biol Chem **282**(27): 19728-19741.

Gillard, E. F., N. A. Affara, J. R. Yates, D. R. Goudie, J. Lambert, D. A. Aitken und M. A. Ferguson-Smith (1987). "Deletion of a DNA sequence in eight of nine families with X-linked ichthyosis (steroid sulphatase deficiency)." Nucleic Acids Res **15**(10): 3977-39785.

Glutek, S. M. und R. Hobkirk (1990). "Estrogen sulfatase and steroid sulfatase activities in intrauterine tissues of the pregnant guinea pig." J Steroid Biochem Mol Biol **37**(5): 707-715.

Green, J. A. und R. M. Roberts (2006). "Establishment of an ELISA for the detection of native bovine pregnancy-associated glycoproteins secreted by trophoblast binucleate Cells." Methods Mol Med **122**: 321-330.

Greven, H., M. P. Kowalewski, B. Hoffmann, J. Geyer, M. Rex-Haffner, B. Ugele und G. Schuler (2007). "Bovine placental steroid sulphatase: Molecular cloning and expression pattern in placentomes during gestation and at parturition." Placenta **28**(8-9): 889-897.

Gross, T. S. und W. F. Williams (1988). "In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition." J Reprod Fertil **83**(2): 565-573.

Hagenbuch, B. und P. Dawson (2004). "The sodium bile salt cotransport family Slc10." Pflügers Arch **447**(5): 566-570.

Hähnel, R., E. Twaddle und T. Ratajczak (1973). "The specificity of the estrogen receptor of human uterus." J Steroid Biochem **4**(1): 21-31.

Hall, T. (1999). "Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.

Haning, R. V., Jr., R. J. Hackett, R. I. Boothroid und J. A. Canick (1990). "Steroid sulphatase activity in the human ovarian corpus luteum, stroma, and follicle: Comparison to activity in other tissues and the placenta." J Steroid Biochem **36**(1-2): 175-179.

Hansen, P. J. (1998). "Regulation of uterine immune function by progesterone--Lessons from the sheep." J Reprod Immunol **40**(1): 63-79.

Hansen, P. J. und S. Tekin (2005). "Pregnancy-associated immunoregulatory molecules discovered in ruminants and their possible relevance to other species." Chem Immunol Allergy **88**: 109-116.

Hansen, P. J. (2007). "Regulation of immune cells in the uterus during pregnancy in ruminants." J Anim Sci **85**(13 Suppl): E30-31.

Henricks, D. M., D. R. Lamond, J. R. Hill und J. F. Dickey (1971). "Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer." J Anim Sci **33**(2): 450-454.

Hobkirk, R., C. Cardy, M. Nilsen und F. Saidi (1982). "Estrone sulfatase activity in guinea pig tissues." J Steroid Biochem **17**(1): 71-76.

Hobkirk, R. und C. A. Cardy (1985). "The in vitro formation of sulfates and glucuronides of estrogens by adult and fetal ovine tissues." Can J Biochem Cell Biol **63**(8): 785-791.

Hoffmann, B., W. C. Wagner und T. Gimenez (1976). "Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term." Biol Reprod **15**(1): 126-133.

Hoffmann, B., W. C. Wagner, E. Rattenberger und J. Schmidt (1977). "Endocrine relationships during late gestation and parturition in the cow." Ciba Found Symp(47): 107-125.

Hoffmann, B. (1979). "Aspects on the formation and detection of tissue levels of anabolic steroids in domestic animals." J Steroid Biochem **11**(1C): 919-922.

Hoffmann, B. (1983). "Use of radioimmunoassay procedures for the determination of sex hormones in animal tissues." J Steroid Biochem **19**(1C): 947-951.

Hoffmann, B., T. Goes de Pinho und G. Schuler (1997). "Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy." Exp Clin Endocrinol Diabetes **105**(5): 296-303.

Hoffmann, B., K. Falter, A. Vielemeier, K. Failing und G. Schuler (2001a). "Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and -sulfatase from midgestation to parturition." Exp Clin Endocrinol Diabetes **109**(5): 294-301.

Hoffmann, R., A. Rot, S. Niiyama und A. Billich (2001b). "Steroid sulfatase in the human hair follicle concentrates in the dermal papilla." J Invest Dermatol **117**(6): 1342-1348.

Hoffmann, B. und G. Schuler (2002). "The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: Observations during the second half of gestation." Domest Anim Endocrinol **23** (1-2): 309-320.

Holinka, C. F. und E. Gurpide (1980). "In vivo uptake of estrone sulfate by rabbit uterus." Endocrinology **106**(4): 1193-1197.

Howell, A. (2001). "Future use of selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitors." Clin Cancer Res **7**(12 Suppl): 4402s-4410s; discussion 4411s-4412s.

- Hradecky, P., H. W. Mossman und G. G. Stott (1988). "Comparative development of ruminant placentomes." Theriogenology **29**: 715-729.
- Huot, R. I. und S. A. Shain (1988). "Differential metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate and estrogen conjugates by normal or malignant Axc/Ssh rat prostate cells and effects of these steroid conjugates on cancer cell proliferation in vitro." J Steroid Biochem **29**(6): 617-621.
- Irwin, J. C., W. H. Utian und R. L. Eckert (1991). "Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial Stromal cells." Endocrinology **129**(5): 2385-2392.
- Iwamori, M., H. W. Moser und Y. Kishimoto (1976a). "Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver: Characterization of estrone sulfatase." Arch Biochem Biophys **174**(1): 199-208.
- Iwamori, M., H. W. Moser und Y. Kishimoto (1976b). "Steroid sulfatase in brain: Comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy." J Neurochem **27**(6): 1389-1395.
- Janowski, T., S. Zdunczyk, J. Malecki-Tepicht, W. Baranski und A. Ras (2002). "Mammary secretion of oestrogens in the cow." Domest Anim Endocrinol **23**(1-2): 125-137.
- Janszen, B., MM. Bevers, HTM. van Tol, SJ. Dieleman, GC van der Weiden und MAM Taverne. (1995). "Oestrogen sulphatase activity in endometrium and foetal membranes of late gestational and artuient cows." Anim. Reprod. Sci. **37**: 251-256.
- Jobsis, A. C., W. P. De Groot, A. E. Meijer und C. M. Van der Loos (1983). "A new method for the determination of steroid sulphatase activity in leukocytes in X-linked recessive ichthyosis." Br J Dermatol **108**(5): 567-572.
- Johnson, W. H., J. G. Manns, W. M. Adams und R. J. Mapletoft (1981). "Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows." Can Vet J **22**(9): 288-290.
- Jordan, V. C. und A. M. Brodie (2007). "Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer." Steroids **72**(1): 7-25.
- Kauffman, F. C. (2004). "Sulfonation in pharmacology and toxicology." Drug Metab Rev **36**(3-4): 823-843.
- Kawano, A., A. H. Payne und R. B. Jaffe (1973). "Gonadal steroid sulfates and sulfatase. VI. Comparative metabolism in isolated seminiferous tubules and minces of human testis." J Clin Endocrinol Metab **37**(3): 441-447.
- Kawano, J. und E. Aikawa (1987). "Regional distribution of arylsulfatase C and estrone-sulfate sulfatase activities in rat brain and hypophysis." Brain Res **409**(2): 391-394.
- Keren, D. F., J. A. Canick, M. Z. Johnson, J. D. Schaldenbrand, R. V. Haning, Jr. und R. Hackett (1995). "Low maternal serum unconjugated estriol during prenatal screening as an

indication of placental steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis." Am J Clin Pathol **103**(4): 400-403.

Klisch, K., C. Pfarrer, G. Schuler, B. Hoffmann und R. Leiser (1999). "Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: Different modes of the generation of multinuclear cells." Anat Embryol (Berl) **200**(2): 229-237.

Klisch, K. und R. Leiser (2003). "In bovine binucleate trophoblast giant cells, pregnancy-associated glycoproteins and placental prolactin-related protein-I are conjugated to asparagine-linked N-acetylgalactosaminyl glycans." Histochem Cell Biol **119**(3): 211-217.

Klisch, K., N. M. De Sousa, J. F. Beckers, R. Leiser und A. Pich (2005). "Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy." Mol Reprod Dev **71**(4): 453-460.

Klisch, K., A. Boos, M. Friedrich, K. Herzog, M. Feldmann, N. Sousa, J. Beckers, R. Leiser und G. Schuler (2006). "The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition." Reproduction **132**(5): 791-798.

Korenman, S. G. und J. F. Krall (1977). "The role of cyclic AMP in the regulation of smooth muscle cell contraction in the uterus." Biol Reprod **16**(1): 1-17.

Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson und J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **138**(3): 863-870.

Kuss, E. (1994). "The fetoplacental unit of primates." Exp Clin Endocrinol **102**(3): 135-165.

Lakshmi, S. und A. S. Balasubramanian (1979). "Studies on the chaotropically solubilized arylsulfatase C and estrone sulfatase of sheep brain." Biochim Biophys Acta **567**(1): 184-195.

Langlais, J., M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau und K. D. Roberts (1981). "Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7266-70.

Laven, R. A. and A. R. Peters (2001). "Gross morphometry of the bovine placentome during gestation." Reprod Domest Anim **36**(6): 289-296.

Lazaridis, K. N., P. Tietz, T. Wu, S. Kip, P. A. Dawson und N. F. LaRusso (2000). "Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11092-11097.

Leiser, R. (1975). "Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind." Zentralbl Veterinarmed [C] **4**(1): 63-86.

Leiser, R., C. Krebs, B. Ebert und V. Dantzer (1997a). "Placental vascular corrosion cast studies: A comparison between ruminants and humans." Microsc Res Tech **38**(1-2): 76-87.

- Leiser, R., C. Krebs, K. Klisch, B. Ebert, V. Dantzer, G. Schuler und B. Hoffmann (1997b). "Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation." J Anat **191** (Pt 4): 517-527.
- Li, P. K., M. E. Rhodes, A. M. Burke und D. A. Johnson (1997). "Memory enhancement mediated by the steroid sulfatase inhibitor (P-O-sulfamoyl)-N-tetradecanoyl tyramine." Life Sci **60**(3): PL45-51.
- Lowis, E. I. und R. E. Oakey (1996). "Steroid sulphatase deficiency: Identification of heterozygotes using hydrolysis of dehydroepiandrosterone sulphate by peripheral leucocytes." Ann Clin Biochem **33** (Pt 3): 219-226.
- Lykkesfeldt, G., A. E. Lykkesfeldt und N. E. Skakkebaek (1984a). "Steroid sulphatase in man: A non inactivated X-locus with partial gene dosage compensation." Hum Genet **65**(4): 355-357.
- Lykkesfeldt, G., M. D. Nielsen und A. E. Lykkesfeldt (1984b). "Placental steroid sulfatase deficiency: Biochemical diagnosis and clinical review." Obstet Gynecol **64**(1): 49-54.
- Lykkesfeldt, G., P. Bennett, A. E. Lykkesfeldt, S. Micic, M. Rorth, N. E. Skakkebaek und B. Svenstrup (1991). "Testis cancer. Ichthyosis constitutes a significant risk factor." Cancer **67**(3): 730-734.
- Martel, C., M. H. Melner, D. Gagne, J. Simard und F. Labrie (1994). "Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 Beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey." Mol Cell Endocrinol **104**(1): 103-111.
- Mason, J. I., J. T. France, R. R. Magness, B. A. Murry und C. R. Rosenfeld (1989). "Ovine placental steroid 17 alpha-hydroxylase/C-17,20-lyase, aromatase and sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition." J Endocrinol **122**(1): 351-359.
- Matamoros, R., I. Caamano, S. V. Lamb und T. J. Reimers (1994). "Estrogen production by bovine binucleated and mononucleated trophoblast cells in vitro." Biolog Reprod **51**: 486-492.
- Mathew, J. und A. S. Balasubramanian (1982). "Arylsulphatase C and estrone sulphatase of sheep hypothalamus, preoptic area and midbrain: Separation by hydrophobic interaction chromatography and evidence for differences in their lipid environment." J Neurochem **39**(5): 1205-1209.
- Mattioli, M., R. Gaiani, G. Bono, und F. Chiesa. (1984). "Estrone to estrone sulfate conversion and viceversa in bovine placentome." Archivio Veterinario Italiano **35**: 22-26.
- Mesiano, S. (2004). "Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition." J Soc Gynecol Investig **11**(4): 193-202.
- Migeon, B. R., L. J. Shapiro, R. A. Norum, T. Mohandas, J. Axelman und R. L. Dabora (1982). "Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome." Nature **299**(5886): 838-840.

-
- Miki, Y., T. Nakata, T. Suzuki, A. D. Darnel, T. Moriya, C. Kaneko, K. Hidaka, Y. Shiotsu, H. Kusaka und H. Sasano (2002). "Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5760-5768.
- Mitchell, B. F., J. Cross, R. Hobkirk und J. R. Challis (1984). "Formation of unconjugated estrogens from estrone sulfate by dispersed cells from human fetal membranes and decidua." J Clin Endocrinol Metab **58**(5): 845-849.
- Mohandas, T., L. J. Shapiro, R. S. Sparkes und M. C. Sparkes (1979). "Regional assignment of the steroid sulfatase-X-linked ichthyosis locus: Implications for a noninactivated region on the short arm of human X chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5779-5783.
- Mohandas, T., R. S. Sparkes, B. Hellkuhl, K. H. Grzeschik und L. J. Shapiro (1980). "Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse-human hybrid cells: Further evidence for the noninactivation of the steroid sulfatase locus in Man." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6759-663.
- Morgan, G., F. B. Wooding, J. F. Beckers und H. G. Friesen (1989). "An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow." J Reprod Fertil **86**(2): 745-752.
- Mossman, H. W. (1987). "Vertebrate fetal membranes." Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NJ.
- Möstl E. und Bamberg, E. (1986). "Östrogenproduktion in der Rinderplazenta in vitro." Zuchthygiene **21**: 159.
- Moyer, D. L. und J. C. Felix (1998). "The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation." Contraception **57**(6): 399-403.
- Munroe, D. G. und P. L. Chang (1987). "Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase." Am J Hum Genet **40**(2): 102-14.
- Mutembei, H. (2006). "Expression of estrogen receptors alpha and beta, aromatase, steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in testes of immature and mature boars." PhD-Thesis JLU Giessen.
- Nakata, T., S. Takashima, Y. Shiotsu, C. Murakata, H. Ishida, S. Akinaga, P. K. Li, H. Sasano, T. Suzuki und T. Saeki (2003). "Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients." J Steroid Biochem Mol Biol **86**(3-5): 455-460.
- Nash, A. R., W. K. Glenn, S. S. Moore, J. Kerr, A. R. Thompson und E. O. Thompson (1988). "Oestrogen sulfotransferase: Molecular cloning and sequencing of cDNA for the bovine placental enzyme." Aust J Biol Sci **41**(4): 507-516.
- Newman, S. P., A. Purohit, M. W. Ghilchik, B. V. Potter und M. J. Reed (2000). "Regulation of steroid sulphatase expression and activity in breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **75**(4-5): 259-264.

- Noel, H., L. Plante, G. Bleau, A. Chapdelaine und K. D. Roberts (1983). "Human placental steroid sulfatase: Purification and properties." J Steroid Biochem **19**(5): 1591-1598.
- Özalp, G. (2005). "Lokalisation der 17alpha-Hydroxylase-C17,20-Lyase, 3beta-Hydroxysteroiddehydrogenase-delta 4/5 Isomerase und Aromatase in der Plazenta beim Rind im Verlauf der Gravidität." Dissertation JLU Giessen.
- Pack, B. A. und S. C. Brooks (1970). "Metabolism of estrogens and their sulfates in rat uterine minces." Endocrinology **87**(5): 924-933.
- Park, I. H., B. K. Han und D. H. Jo (1997). "Distribution and characterization of neurosteroid sulfatase from the bovine brain." J Steroid Biochem Mol Biol **62**(4): 315-320.
- Park-Chung, M., A. Malayev, R. H. Purdy, T. T. Gibbs und D. H. Farb (1999). "Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acid receptor function through distinct sites." Brain Res **830**(1): 72-87.
- Pasqualini, J. R., B. Schatz, C. Varin und B. L. Nguyen (1992). "Recent data on estrogen sulfatases and sulfotransferases activities in human breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 323-329.
- Payne, A. H., R. B. Jaffe und M. R. Abell (1971). "Gonadal steroid sulfates and sulfatase. 3. Correlation of human testicular sulfatase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase, histologic structure and serum testosterone." J Clin Endocrinol Metab **33**(4): 582-591.
- Payne, A. H., C. C. Lawrence, D. L. Foster und R. B. Jaffe (1973). "Intranuclear binding of 17 -estradiol and estrone in female ovine pituitaries following incubation with estrone sulfate." J Biol Chem **248**(5): 1598-15602.
- Pepe, G. J. und E. D. Albrecht (1995). "Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy." Endocr Rev **16**(5): 608-648.
- Pescador, N., K. Soumano, D. M. Stocco, C. A. Price und B. D. Murphy (1996). "Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea." Biol Reprod **55**(2): 485-491.
- Piccinni, M. P. (2005). "T Cells in pregnancy." Chem Immunol Allergy **89**: 3-9.
- Piccinni, M. P., M. G. Giudizi, R. Biagiotti, L. Beloni, L. Giannarini, S. Sampognaro, P. Paronchi, R. Manetti, F. Annunziato und C. Livi (1995). "Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both Il-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones." J Immunol **155**(1): 128-133.
- Pimentel, S. M., C. A. Pimentel, P. G. Weston, J. E. Hixon und W. C. Wagner (1986). "Progesterone secretion by the bovine fetoplacental unit and responsiveness of corpora lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation." Am J Vet Res **47**(9): 1967-1971.
- Piva, M., O. Flieger und V. Rider (1996). "Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent." Biol Reprod **55**(6): 1333-1342.

-
- Purinton, S. C., H. Newman, M. I. Castro und C. E. Wood (1999). "Ontogeny of estrogen sulfatase activity in ovine fetal hypothalamus, hippocampus, and brain stem." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): R1647-1652.
- Reed, M. J., A. Purohit, L. W. Woo, S. P. Newman und B. V. Potter (2005). "Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation, and inhibition." Endocr Rev **26**(2): 171-202.
- Reimers, T. J., M. B. Ullmann und W. Hansel (1985). "Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells." Biol Reprod **33**(5): 1227-1236.
- Rizk, D. E. und K. A. Johansen (1994). "Maternal steroid sulfatase deficiency--Cause of high-risk pregnancy?" Am J Obstet Gynecol **171**(2): 566-567.
- Roberts, K. D. (1987). "Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process." J Steroid Biochem **27**(1-3): 337-341.
- Robertson, H. A. und G. J. King (1979). "Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy." J Reprod Fertil **55**(2): 463-470.
- Roblin, S., M. Nicollier, J. P. Remy-Martin und G. L. Adessi (1986). "Lack of correlation between steroid sulfatase activities and lipid content in uterus and liver microsomes of guinea pigs." Steroids **48**(5-6): 369-379.
- Roselli, C. E. und J. A. Resko (2001). "Cytochrome P450 aromatase (Cyp19) in the non-human primate brain: distribution, regulation, and functional significance." J Steroid Biochem Mol Biol **79**(1-5): 247-253.
- Rostalski, A. (2005). "Untersuchungen zur testikulären Steroidhormonproduktion beim Eber und der Aktivität der Enzyme Östrogensulfotransferase und Arylsulfatase C in Hoden und Nebenhoden." Diss. vet. med. JLU Giessen.
- Roy, A. B. (1976). "Sulphatases, lysosomes and disease." Aust J Exp Biol Med Sci **54**(2): 111-135.
- Ruoff, B. M. und W. L. Daniel (1991). "Comparative biochemistry of mammalian arylsulfatase C and steroid sulfatase." Comp Biochem Physiol B **98**(2-3): 313-322.
- Rüsse, I. und E. Grunert (1993). "Die wachsende Frucht: Altersbestimmung." Tiergeburtshilfe, Paul Parey Verlag: 52-55.
- Salido, E. C., P. H. Yen, L. Barajas und L. J. Shapiro (1990). "Steroid sulfatase expression in human placenta: Immunocytochemistry and in situ hybridization study." J Clin Endocrinol Metab **70**(6): 1564-1567.
- Santen, R. J., D. Leszczynski, N. Tilson-Mallet, P. D. Feil, C. Wright, A. Manni und S. J. Santner (1986). "Enzymatic control of estrogen production in human breast cancer: Relative significance of aromatase versus sulfatase pathways." Ann N Y Acad Sci **464**: 126-137.
- Santner, S. J., P. D. Feil und R. J. Santen (1984). "In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: Relative importance versus the aromatase pathway." J Clin Endocrinol Metab **59**(1): 29-33.

Saoud, C. J. und C. E. Wood (1997). "Modulation of ovine fetal adrenocorticotropin secretion by androstenedione and 17beta-estradiol." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): R1128-1134.

Schallenberger, E., J. Rampp und D. L. Walters (1985). "Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. II. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout Pregnancy." Acta Endocrinol (Copenh) **108**(3): 322-330.

Schindler, A. E. (1997). "Progestins and the Endometrium." Zentralbl Gynakol **119 Suppl 2**: 59-63.

Schnorr, B. (1996). "Embryologie der Haustiere." Ferdinand Enke Verlag, 3.Auflage: 64, 85

Schuler, G., F. Hartung und B. Hoffmann (1994). "Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow." Exp Clin Endocrinol **102**(3): 169-174.

Schuler, G., C. Wirth, K. Klisch, C. Pfarrer, R. Leiser und B. Hoffmann (1999). "Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition." Biol Reprod **61**(3): 797-801.

Schuler, G. (2000). "Plazentare Steroide beim Rind. Biosynthese und Beziehung zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome." Habilitationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin JLU Giessen.

Schuler, G., C. Wirth, U. Teichmann, K. Failing, R. Leiser, H. Thole und B. Hoffmann (2002). "Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition." Biol Reprod **66**(4): 976-982.

Schuler, G., U. Teichmann, A. Taubert, K. Failing und B. Hoffmann (2005). "Estrogen receptor beta (ER β) is expressed differently from ER alpha in bovine placentomes." Exp Clin Endocrinol Diabetes **113**(2): 107-114.

Schuler, G., G. R. Ozalp, B. Hoffmann, N. Harada, P. Browne und A. J. Conley (2006a). "Reciprocal expression of 17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: A two-cell system drives placental oestrogen synthesis." Reproduction **131**(4): 669-679.

Schuler, G., U. Teichmann, M. P. Kowalewski, B. Hoffmann, E. Madore, M. A. Fortier und K. Klisch (2006b). "Expression of cyclooxygenase-II (Cox-II) and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20alpha-HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: Implications for the initiation of parturition in cattle." Placenta **27**(9-10): 1022-1029.

Shankaran, R., M. Ameen, W. L. Daniel, R. G. Davidson und P. L. Chang (1991). "Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta." Biochim Biophys Acta **1078**(2): 251-257.

Shapiro, L. J., T. Mohandas, R. Weiss und G. Romeo (1979). "Non-inactivation of an X-chromosome locus in man." Science **204**(4398): 1224-1226.

Shapiro, L. J., P. Yen, D. Pomerantz, E. Martin, L. Rolewic und T. Mohandas (1989). "Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus." Proc Natl Acad Sci USA **86**(21): 8477-8481.

Shapiro, L. J. (1985). "Steroid sulfatase deficiency and the genetics of the short arm of the human X chromosome." Adv Hum Genet **14**: 331-81, 388-389.

Shemesh, M., M. Izhar, M. Pasmanik und L. S. Shore (1992). "Regulation of steroidogenesis in the bovine placenta." J Physiol Pharmacol **43**(4 Suppl 1): 153-163.

Shemesh, M., M. Gurevich, D. Mizrahi, L. Dombrowski, Y. Stram, M. J. Fields und L. S. Shore (1997). "Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine uterine veins: LH induction of cyclooxygenase and augmentation of prostaglandin production in bovine uterine veins." Endocrinology **138**(11): 4844-4851.

Skarda, J., P. Tersch, E. Urbanova, J. Picha und J. Bilek (1982). "Artificial induction of lactation in dry cows." Physiol Bohemoslov **31**(6): 563-568.

Stanway, S. J., A. Purohit, L. W. Woo, S. Sufi, D. Vigushin, R. Ward, R. H. Wilson, F. Z. Stanczyk, N. Dobbs, E. Kulinskaya, M. Elliott, B. V. Potter, M. J. Reed und R. C. Coombes (2006). "Phase I study of Stx 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: The first study of a steroid sulfatase inhibitor." Clin Cancer Res **12**(5): 1585-1592.

Stanway, S. J., P. Delavault, A. Purohit, L. W. Woo, C. Thurieau, B. V. Potter und M. J. Reed (2007). "Steroid sulfatase: A new target for the endocrine therapy of breast cancer." Oncologist **12**(4): 370-374.

Steckelbroeck, S., A. Nassen, B. Ugele, M. Ludwig, M. Watzka, A. Reissinger, H. Clusmann, D. Lutjohann, L. Siekmann, D. Klingmüller und V. H. Hans (2004). "Steroid sulfatase (Sts) expression in the human temporal lobe: Enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study." J Neurochem **89**(2): 403-417.

Stein, C., A. Hille, J. Seidel, S. Rijnbout, A. Waheed, B. Schmidt, H. Geuze und K. von Figura (1989). "Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation and subcellular distribution in BHK-21 cells." J Biol Chem **264**(23): 13865-13872.

Strahl, H. (1912). "Zur Kenntnis der Wiederkäuerplazentome." Anat. Anz. **40**: 257-264.

Sugawara, T. und S. Fujimoto (2004). "The potential function of steroid sulfatase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression." Biochem J **380** (Pt 1): 153-160.

Sugawara, T., E. Nomura und N. Hoshi (2006). "Both N-terminal and C-terminal regions of steroid sulfatase are important for enzyme activity." J Endocrinol **188**(2): 365-374.

Takagi, M. Y., D. Yamamoto, M. Ohtani, und A. Miyamoto (2007). "Quantitative analysis of Messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum." Mol. Reprod. Dev. **74**: 801-807.

Tammi, R. (1982). "Effects of sex steroids on human skin in organ culture." Acta Derm Venerol **62**(2): 107-112.

Tobacman, J. K., M. Hinkhouse und Z. Khalkhali-Ellis (2002). "Steroid sulfatase activity and expression in mammary myoepithelial cells." J Steroid Biochem Mol Biol **81**(1): 65-68.

Traupe, H. und R. Happle (1983). "Clinical spectrum of steroid sulfatase deficiency: X-linked recessive ichthyosis, birth complications and cryptorchidism." Eur J Pediatr **140**(1): 19-21.

Tremollieres, F. A., D. D. Strong, D. J. Baylink und S. Mohan (1992). "Progesterone and promegestone stimulate human bone cell proliferation and insulin-like growth factor-2 production." Acta Endocrinol (Copenh) **126**(4): 329-337.

Tsumagari, S., J. Kamata, K. Takagi, K. Tanemura, A. Yosai und M. Takeishi (1994). "3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition." J Reprod Fertil **102**(1): 35-39.

Ushizawa, K., T. Takahashi, M. Hosoe, H. Ishiwata, K. Kaneyama, K. Kizaki und K. Hashizume (2007). "Global gene expression analysis and regulation of the principal genes expressed in bovine placenta in relation to the transcription factor AP-2 family." Reprod Biol Endocrinol **5**: 17.

Utsumi, T., N. Yoshimura, S. Takeuchi, J. Ando, M. Maruta, K. Maeda und N. Harada (1999). "Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer." Cancer Res **59**(2): 377-381.

Vaccaro, A. M., R. Salvioli, M. Muscillo und L. Renola (1987). "Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta." Enzyme **37**(3): 115-126.

Verduzco Gomez, A., L. Miranda, B. Murphy und A. Quero (2007). "Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in caruncular and cotyledonary bovine tissues during the first half of the gestation." Biol Reprod (Special issue. Abstract book. Society for the Study of Reproduction. 40th Annual Meeting, July 21-July 25, 2007, San Antonio, Texas).

Visser, T. J. (1996). "Pathways of thyroid hormone metabolism." Acta Med Austriaca **23** (1-2): 10-16.

Vogel, W., M. Grompe, R. Storz und S. Pentz (1984). "A comparative study on steroid sulfatase and arylsulfatase C in fibroblast clones from 45,X/47,XXX and 69,XXY." Hum Genet **66**(4): 367-169.

Wathes, D. C. und F. B. Wooding (1980). "An electron microscopic study of implantation in the cow." Am J Anat **159**(3): 285-306.

Wendorf, G. L., M. S. Lawyer und N. L. First (1983). "Role of the adrenals in the maintenance of pregnancy in cows." J Reprod Fertil **68**(2): 281-287.

Willemsen, R., M. Kroos, A. T. Hoogeveen, J. M. van Dongen, G. Parenti, C. M. van der Loos und A. J. Reuser (1988). "Ultrastructural localization of steroid sulphatase in cultured

human fibroblasts by immunocytochemistry: A comparative study with lysosomal enzymes and the mannose 6-phosphate receptor." Histochem J **20**(1): 41-51.

Woicke, J., H. A. Schoon, W. Heuwieser, L. C. Schulz und E. Grunert (1986). "Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind." Zentralbl Veterinarmed A **33**(9): 660-667.

Woo, L. W., C. Bubert, O. B. Sutcliffe, A. Smith, S. K. Chander, M. F. Mahon, A. Purohit, M. J. Reed und B. V. Potter (2007). "Dual aromatase-steroid sulfatase inhibitors." J Med Chem.

Wood, C. E. und T. A. Cudd (1997). "Development of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis of the equine fetus: A comparative review." Equine Vet J Suppl(24): 74-82.

Wood, C. E., C. J. Saoud, T. A. Stoner und M. Keller-Wood (2001). "Estrogen and androgen influence hypothalamic AVP and CRF concentrations in fetal and adult sheep." Regul Pept **98**(1-2): 63-68.

Wood, C. E., K. E. Gridley und M. Keller-Wood (2003). "Biological activity of 17beta-estradiol-3-sulfate in ovine fetal plasma and uptake in fetal brain." Endocrinology **144**(2): 599-604.

Wood, C. E. (2005). "Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain." J Soc Gynecol Investig **12**(2): 67-76.

Wooding, F. B. und D. C. Wathes (1980). "Binucleate cell migration in the bovine placenta." J Reprod Fertil **59**(2): 425-430.

Wooding, F. B. (1982). "The role of the binucleate cell in ruminant placental structure." J Reprod Fertil Suppl **31**: 31-39.

Wooding, F. B. (1983). "Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants." Placenta **4 Spec No**: 527-539.

Wooding, F. B., G. Morgan, I. A. Forsyth, G. Butcher, A. Hutchings, S. A. Billingsley und P. D. Gluckman (1992). "Light and electron microscopic studies of cellular localization of oPL with monoclonal and polyclonal antibodies." J Histochem Cytochem **40**(7): 1001-1009.

Wooding, F. B., R. M. Roberts und J. A. Green (2005). "Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: Possible functional implications." Placenta **26**(10): 807-827.

Yanaihara, A., T. Yanaihara, Y. Toma, Y. Shimizu, H. Saito, T. Okai, T. Higashiyama und Y. Osawa (2001). "Localization and expression of steroid sulfatase in human fallopian tubes." Steroids **66**(2): 87-91.

Yen, P. H., E. Allen, B. Marsh, T. Mohandas, N. Wang, R. T. Taggart und L. J. Shapiro (1987). "Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in Sts deficiency: Implications for X-Y interchange." Cell **49**(4): 443-454.

Zoli, A. P., P. Demez, J. F. Beckers, M. Reznik und A. Beckers (1992). "Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome." Biol Reprod **46**(4): 623-629.

9 Anhang

9.1 Bestätigung der Spezifität des in der Immunhistologie eingesetzten Antiserums für die bovine Steroidsulfatase mittels Western Blot

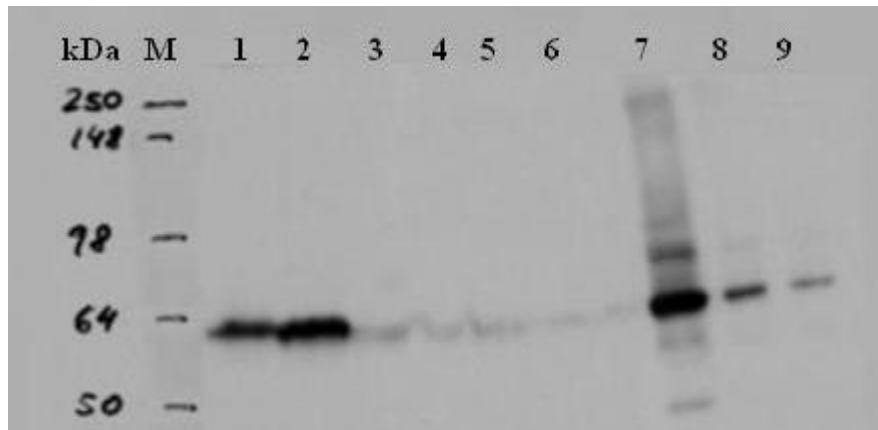


Abb. 28: Western Blot unter Verwendung des Serums eines Kaninchens, das gegen die humane plazentare Steroidsulfatase immunisiert wurde (Verdünnung: 1:10000).

M = Größenmarker

1 = mikrosomale Proteinfraction aus einem Rinderplazentom (8 µg; Trächtigkeitstag 150)

2 = mikrosomale Proteinfraction aus einem Rinderplazentom (8 µg; Trächtigkeitstag 220)

3, 4 = Homogenate aus Rinderplazentomen (36 µg bzw. 24 µg; Trächtigkeitstag 142)

5, 6 = Homogenate aus Rinderplazentomen (42 µg bzw. 28 µg; Trächtigkeitstag 187)

7-9 = Homogenate aus menschlicher Geburtsplazenta (50 µg, 10 µg bzw. 5µg)

Das Experiment wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Bernhard Ugele, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, I. Frauenklinik Innenstadt durchgeführt und das Ergebnis freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Im Western Blot unter Verwendung von Serum eines Kaninchens, das gegen die humane plazentare Steroidsulfatase immunisiert wurde (Dibbelt und Kuss 1986; Dibbelt et al. 1989), zeigte sich sowohl in den Proben aus Rinderplazentomen als auch in der menschlichen Geburtsplazenta eine einzige klare Bande bei ca. 62 kDa. Diese Bande fehlte, wenn im Kontroll-experiment Prä-Immunsersum als Negativkontrolle verwendet wurde (Ergebnis nicht dargestellt). Das Molekulargewicht der Bande entspricht dem anhand der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht der bovinen (64,4kDa) und humanen (65,5kDa) Steroidsulfatase. Bezüglich der Proben aus Rinderplazentomen passt die intensivere Reaktion mit den mikrosomalen Fraktionen im Vergleich zu den Gewebekomogenaten zu Ergebnissen aus Aktivi-

tätsmessungen unter Verwendung von subzellulären Fraktionen, nach denen die Steroidsulfataseaktivität primär in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist (Hoffmann et al, 2001a).

9.2 Verwendete Schmelztemperaturen der Primerpaare in der RT-PCR

Steroidsulfatase

Name	Sequenz	verwendete Schmelztemperatur
Sts1_for	5'-CGTCCTGCTGATGGCTGACG-3'	61,5°C
Sts1_rev	5'-TCGAAGAGAAGAGAGCCGTG-3'	
Sts2_for	5'-ACGACAACCTCACGCAGAG-3'	59,5°C
Sts2_rev	5'-GGAAATCTCAAACAGCAGGG-3'	
Sts_3_for	5'-TGGCACCCACCCAACAGCACG-3'	65,0°C
Sts_4_rev	5'-GTCGATATTGGGAGTCCTGAGT-3'	
Sts_exp_for	5'-GACATGATGACCCTTCTGCTTC-3'	64,0°C
Sts_exp_mitStop_rev	5'-GTAACGGCTAAGGGCTGTGTC-3'	

Soat

Name	Sequenz	verwendete Schmelztemperaturen
bovSOAT1_for	5'-GCCACTCTGCCTTTATCTCTAC-3'	60,3°C
bovSOAT1_rev	5'-CTTCTTGACAACCTGGGCTTCTC-3'	
bovSOAT2_for	5'-GAACCTGGACCTCGTATTCACAG-3'	65,0°C
bovSOAT2_rev	5'-AGAGTGGCTTCTTCATTACCTC-3'	
bovSOAT3_for	5'-TTGTGATGCTGCCTTATGGAG-3'	65,0°C
bovSOAT3_rev	5'-CATTGTGGAACAGGTTGTCATAC-3'	
bovSOAT4_for	5'-GGCTTTCTCCTGGCACTTCTTACC-3'	66,0°C
bovSOAT4_rev	5'-GGTGTAGTCAAACCAACAAGCC-3'	
bovSOAT5_for	5'-CAGGGGGAACGTCTCAAAC-3'	60,0°C
bovSOAT5_rev	5'-AGGCACACAAGGGTGATTC-3'	
bovSOAT6_for	5'-CAGAGACCCTGAAAATAGGAC-3'	62,0°C
bovSOAT6_rev	5'-AGGACTTAGAGTGGCTTCTTC-3'	

Soat_anfg_for	5'-GGAGATAAGGAGATGAGAGCAA-3'	64,0°C
Soat_MS_rev	5'-ACAAGCCCCTACTTGGCACG-3'	

9.3 Verzeichnis von Publikationen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der eigenen Arbeit

9.3.1 Originalarbeiten und Reviews

Greven H, Kowalewski MP, Hoffmann B, Rex-Haffner M, Ugele B, Schuler G (2007)
Molecular cloning of bovine placental steroid sulfatase and its expression pattern in placentomes during gestation and at parturition. *Placenta* 28, 889-897.

Schuler G, **Greven H**, Kowalewski MP, Döring B, Özalp GR, Hoffmann B (2008)
"Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation?" *Exp Clin Endocrinology Diabetes* (Epub ahead of print:
<http://www.thieme-connect.de/ejournals/pdf/eced/doi/10.1055/s-2008-1042408.pdf>)

9.3.2 Abstracts von Vorträgen und Postern

Greven H, Ugele B, Rex-Haffner M, Schuler G (2005)
Immunolocalisation of steroid sulfatase in bovine placentomes.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 147, 59

Greven H, Kowalewski MP, Geyer J, Ugele B, Rex-Haffner M, Hoffmann B, Schuler G (2006)
Steroid sulfatase in bovine placentomes: partial cloning and expression pattern during gestation and at parturition. *Biology of Reproduction* (Special Issue), S 161 (Poster 399)

Schuler G, **Greven H**, Hoffmann B, Döring B, Geyer J (2008)
Expression of the sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) in bovine placentomes. *Reproduction in Domestic Animals* (im Druck)

9.3.3 Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen, von denen keine Abstracts publiziert wurden

Greven H, Kowalewski MP, Geyer J, Ugele B, Rex-Haffner M, Hoffmann B, Schuler G (2006)

Plazentare Steroidsulfatase (StS) des Rindes: Klonierung und Expression im Verlauf der Graviddität und unter der Geburt.

16. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der DVG (19.-21. Februar 2006 in Giessen).

Greven H, Kowalewski M, Geyer J, Ugele B, Hoffmann B, Schuler G (2006). Investigations on synthesis, transport and functions of sulfoconjugated estrogens in the bovine placenta. Meeting on Pregnancy, Parturition and the Postpartum Period (24.-25. August 2006 in Tartu, Estland).

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler für die Überlassung dieses interessanten Themas und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und Beratung und seine engagierte Hilfe bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit, sowie die Möglichkeit an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen. Besonders der Sommer 2006 mit den Besuchen in Tartu, Omaha und Kalifornien wird mir in lebhafter Erinnerung bleiben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. hc Bernd Hoffmann herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die finanzielle und organisatorische Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen, die viele anregende, fachliche Gespräche und seinem Interesse und Förderung meiner beruflichen Weiterentwicklung.

Professor Petzinger und Professor Bauerfeind danke ich für die Aufnahme in das DFG Graduiertenkolleg 455 „Molekulare Veterinärmedizin“. Die damit verbundenen drei Jahre haben mir fachlich viel gebracht. Des Weiteren danke ich auch allen Stipendiaten des Graduiertenkollegs für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung während der Höhen und Tiefen der Doktorandenzeit.

Beim PhD-Programm der Justus-Liebig-Universität Giessen, insbesondere bei Herrn Stamer, bedanke ich mich für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an alle Mitarbeiter der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II.

Ein großes Dankeschön geht dabei an Ulla Teichmann, für ihre ersten Einführungen in die Welt der Molekularbiologie und Frau Margret Bach als ruhender Pol in stürmischen Zeiten im Institut.

Beim RIA-Labor Team möchte ich mich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Herrn Damm für seine Hilfe beim Kampf gegen Computerärgernisse und Sabine für ihre technische Unterstützung im Zellkulturlabor.

Ein weiterer großer Dank richtet sich an meine Mitdoktoranden Gözde Ozalp, Henry Mutembei, Maike Gruhn, Carolin Ludwig, Peter Richterich, Astrid Spang, Marc Dilly, Sima Shenavei, Pershotam, sowie an Sandra Goericke-Pesch. Ohne das gute Arbeitsklima, die gemeinsamen Gespräche und Feiern wäre diese Arbeit kaum bewältigbar gewesen.

Herrn Prof. Dr. Petzinger, Prof. Dr. Leiser, Prof. Dr. Bergmann, Prof. Dr. Bülte und ihren Mitarbeiter danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und die Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dr. Ugele (Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, I. Frauenklinik Innenstadt für die Bereitstellung des Steroidsulfataseantiseraums und des Western Blots, sowie Herrn Dr. Failing für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Mein Dank geht auch an meinen Mitstreiter in der Zellkultur und auf dem Schlachthof, Philip Bridger, an meine Kollegin Babara Döring für ihre Hilfe bei den Versuchen mit dem bovinen Soat, sowie an meine Lehrmeister, die mich mit den faszinierenden Tiefen der Molekularbiologie, besonders dem Umgang mit Sequenzen und Klonen eingeführt haben und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten, PhD Mariusz Kowalewski und Prof. Dr. Achim Geyer.

Mein größter Dank richtet sich jedoch an meine Familie und meinen Freund Thomas Kisselbach. Sie haben mich auf meinem Weg immer unterstützt und ermutigt. Gerade in den stressigen Phasen dieser Dissertation waren ihre Ruhe, Kraft und Ermutigung wichtig und hilfreich. Ohne sie wäre dieses Werk nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

11 Lebenslauf

Name: Helga Edith Greven
Geburtsdatum: 22. November 1978
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Kontaktadresse

Privat: Große Wendelstr. 19
35510 Butzbach

Dienstlich: Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Industriepark Höchst H821
65926 Frankfurt am Main
Tel: 069-305-13866

E-Mail: helga_greven@gmx.de

Schulische und universitäre Ausbildung

2004-2008	Promotionsstudium im Rahmen des PhD-Programmes der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen
2004-2007	DFG Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ der Justus-Liebig-Universität Giessen
1998-2004	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen Staatsexamen mit der Gesamtnote 1,9
1991-1998	Abtei Gymnasium Brauweiler, Abitur mit der Gesamtnote 1,7
1989-1991-	Otto-Hahn-Gymnasium, Bergisch-Gladbach
1985-1989	kath. Grundschule „An der Steinbreche“, Bergisch-Gladbach (Refrath)



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5319-2



9 783835 195319 2